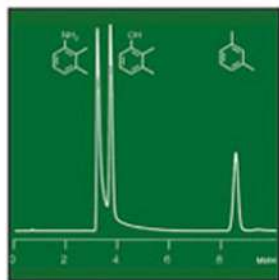


ХИМИИ

Вероника Р. Майер

Практическая
высокоэффективная
жидкостная хроматография
Издание 5-е



ТЕХНОСФЕРА



М И И М И И Р И

Вероника Р. Майер

Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография Издание 5-е

Перевод с английского
к.х.н. И.А. Петухова,
О.А. Петуховой,
к.б.н. С.Б. Гомбоевой,
А.А. Богомолова,
В.М. Бару,
к.т.н. М.Б. Бару
под общей редакцией
к.т.н. М.Б. Бару

ТЕХНОСФЕРА
Москва
2017

УДК 543.544.5 ББК 24.58

М14

М14 Майер Вероника Р.

Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография.

Издание 5-е.

Москва: ТЕХНОСФЕРА, 2017. - 408 с. + 8 с. цв. вкл.

ISBN 978-5-94836-480-3

Представляем читателю 5-е издание книги, которое расширено за счет современных методов и оборудования. В книге многое доработано, добавлено большое количество ссылок. Те места в тексте, где не хватало информации о современном положении дел в ВЭЖХ или нужны были дополнительные разъяснения, снабжены примечаниями переводчиков, также добавлены ссылки на соответствующую литературу. В издание включена новая тема – контроль качества. Два раздела в приложениях были обновлены и расширены Бруно И. Ленда - раздел о тестировании хроматографической системы и раздел о выявлении и устранении неисправностей. Были написаны некоторые новые разделы.

Книга отличается простотой изложения и, что не менее важно, такими же простыми и понятными иллюстрациями, значительно облегчающими понимание излагаемого материала. Несомненное достоинство книги — множество практических задач, которые автор предлагает решить начинающему хроматографисту в ходе обучения.

Издание рекомендовано начинающим изучать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

УДК 543.544.5

ББК 24.58

© 2010 by John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Все права защищены. Авторизованный перевод с английского издания «Джон Вайли энд Санс Лимитед». АО РИЦ «ТЕХНОСФЕРА» несет полную ответственность за правильность перевода. «Джон Вайли энд Санс Лимитед» освобождается от этой ответственности.

©2017, АО «РИЦ «ТЕХНОСФЕРА», перевод на русский язык, оригинал-макет, оформление

ISBN 978-5-94836-480-3

ISBN 978-0-470-68218-0 (англ.)

Practical High-Performance
Liquid Chromatography

FIFTH EDITION

Veronika R. Meyer
Swiss Federal Laboratories
for Materials Testing and
Research (EMPA),
St. Gallen,
Switzerland

WILEY
John Wiley & Sons, Inc.

Памяти Отто Майера

Alles ist einfacher, als man denken kann,
zugleich verschränkter, als zu begreifen ist.

Goethe, *Maximen*

Все проще, чем можно себе представить,
И в то же время сложнее, чем можно понять...

Гёте, *Максимы и размышления*

Содержание

Предисловие к пятому изданию	13
Предисловие редактора перевода	14
Важные и полезные формулы в ВЭЖХ	15
Глава 1. Введение	18
1.1. ВЭЖХ: эффективный метод разделения	18
1.2. Первый эксперимент с ВЭЖХ	18
1.3. Виды разделений в жидкостной хроматографии	20
1.4. Хроматографическая система для ВЭЖХ	22
1.5. Безопасность в хроматографической лаборатории	23
1.6. Сравнение высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии	24
1.7. Сравнение высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза	25
1.8. Единицы измерения давления, длины и вязкости	26
1.9. Научные журналы	27
1.10. Рекомендованные книги	27
Глава 2. Теоретические принципы	29
2.1. Хроматографический процесс	29
2.2. Размывание зоны	31
2.3. Хроматограмма и ее суть	35
2.4. Графическое изображение пар пиков с разной степенью разрешения	41
2.5. Факторы, влияющие на разрешение	45
2.6. Внеколоночные объемы (мертвые объемы)	50
2.7. Размывание заднего фронта пика	51
2.8. Пиковая емкость и статистическая вероятность разрешения	55
2.9. Влияние температуры на ВЭЖХ-разделение	58
2.10. Возможности ВЭЖХ	60
2.11. Как определить пиковую емкость	64
Глава 3. Насосы	66
3.1. Общие требования	66
3.2. Короткоходовый плунжерный насос	66
3.3. Обслуживание и ремонт	69
3.4. Другие конструкции насосов	71
Глава 4. Подготовка оборудования к нанесению образца	72
4.1. Выбор подвижной фазы	72
4.2. Приготовление подвижной фазы	74

Универсальная ВЭЖХ-платформа AZURA



Лучшее аппаратное решение
задач препаративной
хроматографии

Позволяет разработать метод
очистки на аналитических
колонках и трансформировать
его в технологию с нагрузками
до сотен грамм за
хроматографический цикл

Эффективные препаративные колонки аксиального сжатия
с повышенным сроком эксплуатации

Специальное решение для простого и надежного термостатирования

Высокопроизводительный ВЭЖХ-насос
со сменными головками, в т.ч. титановыми для биополимеров

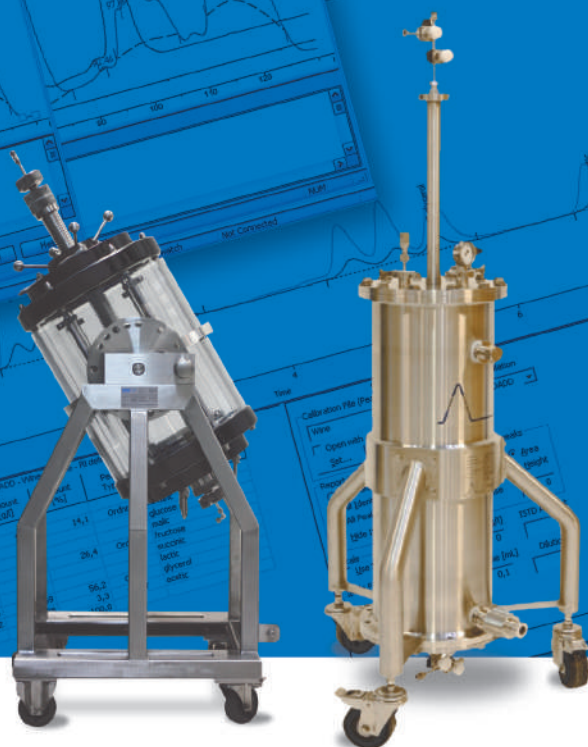
Потоки от 0,01 до 100 мл/мин

- Различная комплектация вспомогательных блоков Assistant - неперекрывающие краны для ввода пробы, сбора фракций и дополнительного детектирования, широкий набор ячеек с переменной длиной оптического пути - позволяет решать любые задачи препаративного разделения
- Интеллектуальное программное обеспечение максимально оптимизирует работу системы, повышает производительность и экономит растворители
- Предусмотрена возможность управления при помощи мобильного приложения по сети Wi-Fi

4.3. Градиентные системы	76
4.4. Капилляры	77
4.5. Фитинги (соединительные муфты)	80
4.6. Инжекторы для введения пробы	81
4.7. Раствор образца и его объем	84
Глава 5. Свойства растворителей	87
5.1. Таблица органических растворителей	87
5.2. Селективность растворителя	90
5.3. Смешиваемость	91
5.4. Буферы	91
5.5. Срок годности элюентов	94
5.6. Калькулятор смесей элюентов	95
Глава 6. Детекторы	97
6.1. Общие положения	97
6.2. УФ-детекторы	102
6.3. Рефрактометрические детекторы	104
6.4. Флуоресцентные детекторы	106
6.5. Электрохимические (амперометрические) детекторы	108
6.6. Детекторы светорассеяния	109
6.7. Другие детекторы	111
6.8. Комплексное детектирование	112
6.9. Непрямое (косвенное) детектирование	114
6.10. Сочетание ВЭЖХ со спектроскопией	114
Глава 7. Колонки и сорбенты	121
7.1. Колонки для ВЭЖХ	121
7.2. Предколонки	123
7.3. Основные свойства сорбентов	124
7.4. Силикагель	129
7.5. Химически модифицированные силикагели	131
7.6. Соплимеры стирола и дивинилбензола	135
7.7. Другие стационарные фазы	137
7.8. Хранение и регенерация колонки	141
Глава 8. Тестирование ВЭЖХ-колонок	145
8.1. Простое тестирование ВЭЖХ-колонок	145
8.2. Определение размера частиц	147
8.3. Определение времени проскока	148
8.4. Тестовая смесь	150
8.5. Безразмерные параметры, характеризующие колонку ВЭЖХ	152

ФИЗЛАБПРИБОР

- материалы и оборудование для аналитической, препаративной и промышленной жидкостной хроматографии
- консультации, семинары, обучение персонала
- помощь в разработке методик для анализа фармпрепаратов и препаративного разделения



ФЛП
ФизЛабПРибор

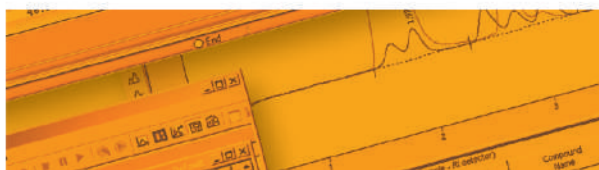
Для препаративной и промышленной хроматографии

- Системы и компоненты
- Стальные и стеклянные колонны
- Сорбенты в балк-упаковках и упакованные колонны

Для ВЭЖХ, Ультра-ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, Ультра-ВЭЖХ-МС

- Колонки
- Капилляры, краны, переходники, растворители и буферные растворы
- Специальные растворители
- Аксессуары

117587, Москва, Варшавское ш., д. 125 Ж, корп. 5
Тел.: +7 495 280-13-48, 740-54-06
www.fizlabpribor.ru, e-mail: info@fizlabpribor.ru

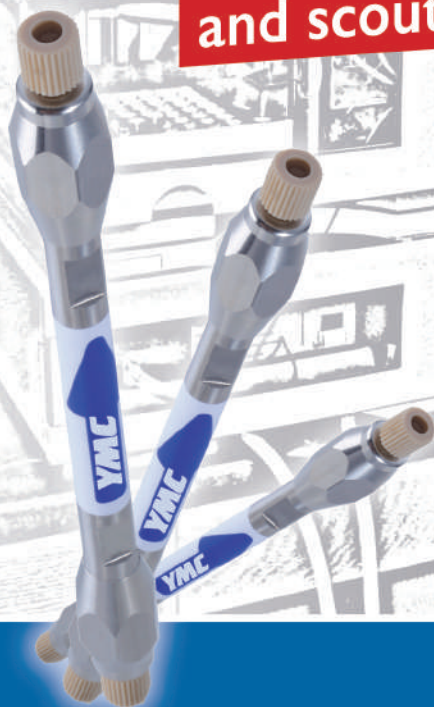


8.6. Уравнение Ван-Деемтера с приведенными параметрами и его использование в диагностике колонок.....	154
8.7. Кривые Ван-Деемтера и другие зависимости.....	156
8.8. Коэффициенты диффузии.....	158
Глава 9. Адсорбционная хроматография: нормально-фазовая хроматография.....	161
9.1. Что такое адсорбция?.....	161
9.2. Элюотропный ряд.....	164
9.3. Селективные свойства подвижной фазы.....	164
9.4. Выбор и оптимизация состава подвижной фазы.....	167
9.5. Приложения.....	170
Глава 10. Обращенно-фазовая хроматография.....	173
10.1. Основы.....	173
10.2. Подвижная фаза в обращенно-фазовой хроматографии.....	175
10.3. Селективность и сила растворителей.....	177
10.4. Обращенно-фазовые неподвижные сорбенты.....	180
10.5. Разработка методики в обращенно-фазовой хроматографии.....	185
10.6. Приложения.....	186
10.7. Хроматография гидрофобных взаимодействий.....	189
Глава 11. Хроматография на химически привитых фазах.....	192
11.1. Введение.....	192
11.2. Свойства некоторых стационарных фаз.....	192
11.3. Хроматография гидрофильных взаимодействий.....	196
Глава 12. Ионообменная хроматография.....	198
12.1. Введение.....	198
12.2. Принцип ионообменной хроматографии.....	198
12.3. Свойства ионообменников.....	199
12.4. Влияние подвижной фазы.....	201
12.5. Особые возможности ионного обмена.....	203
12.6. Практическое применение.....	205
12.7. Практические приложения.....	207
Глава 13. Ион-парная хроматография.....	210
13.1. Введение.....	210
13.2. Практическая ион-парная хроматография.....	211
13.3. Другие области применения.....	213
13.4. Приложение: УФ-детектирование при помощи ИПА.....	214

The “heart”
of any
(U)HPLC
system...
is a great
column...

YMC
EUROPE GMBH

Free testing
and scouting!



Reproducibility

- day to day
- column to column
- lab to lab

Robustness

Scalability

Selectivity

YMC-portfolio: (U)HPLC-columns, (semi) prep columns,
bulk media, laboratory and pilot scale glass columns

Discover more at: www.ymc.de

Contact: e-mail: info@ymc.de, phone: +49 (0) 2064 427-0

Глава 14. Ионная хроматография	216
14.1. Основы	216
14.2. Способы подавления	216
14.3. Элюенты	218
14.4. Область применения	220
Глава 15. Эксклюзионная хроматография	221
15.1. Принцип	221
15.2. Калибровочная хроматограмма	224
15.3. Определение молекулярной массы с помощью эксклюзионной хроматографии	227
15.4. Соединение нескольких колонок для эксклюзионной хроматографии	230
15.5. Фазовые системы	231
15.6. Приложения	232
Глава 16. Аффинная хроматография	236
16.1. Механизм	236
16.2. Аффинная хроматография как частный случай ВЭЖХ	237
16.3. Применение	239
Глава 17. Выбор метода	242
17.1. Различные варианты и возможности	242
17.2. Перенос методики	246
Глава 18. Проблемы разделения	249
18.1. Проблема элюирования	249
18.2. Градиенты	250
18.3. Переключение колонок	255
18.4. Комплексная двумерная ВЭЖХ	258
18.5. Оптимизация изократического разделения с помощью четырех растворителей	260
18.6. Оптимизация других параметров	263
18.7. Смешанные сорбенты	268
Глава 19. Аналитическая ВЭЖХ	270
19.1. Качественный анализ	270
19.2. Анализ следовых количеств вещества	272
19.3. Количественный анализ	276
19.4. Извлечение	281
19.5. Определение высоты и площади пика для количественного анализа	283

19.6. Ошибки интегрирования.....	287
19.7. Длина волны детектирования.....	288
19.8. Дериватизация.....	290
19.9. Неожиданные пики: пики-призраки и системные пики.....	292
Глава 20. Обеспечение качества.....	295
20.1. Стоит ли тратить на это силы?.....	295
20.2. Подтверждение вторым методом.....	296
20.3. Метод валидации.....	296
20.4. Стандартные операционные процедуры.....	298
20.5. Погрешность измерения.....	299
20.6. Аттестация, тестирование прибора и тест на пригодность системы.....	300
20.7. Задача определения качества.....	302
Глава 21. Препаративная ВЭЖХ.....	305
21.1. Задачи.....	305
21.2. Препаративная ВЭЖХ на практике.....	306
21.3. Перегрузка.....	309
21.4. Сбор фракций.....	312
21.5. Рехроматография.....	313
21.6. Вытеснительная хроматография.....	314
Глава 22. Разделение энантиомеров.....	316
22.1. Введение.....	316
22.2. Хиральные подвижные фазы.....	318
22.3. Твердый носитель, покрытый хиральной жидкой неподвижной фазой.....	319
22.4. Хиральные твердые неподвижные фазы.....	320
22.5. Непрямой метод разделения энантиомеров.....	327
Глава 23. Особые возможности.....	330
23.1. Капиллярная ВЭЖХ, микро-ВЭЖХ и ВЭЖХ на чипе.....	330
23.2. Высокоскоростная и сверхскоростная ВЭЖХ.....	333
23.3. Экспресс-разделения при 1000 бар: УВЭЖХ.....	336
23.4. ВЭЖХ со сверхкритическими подвижными фазами.....	337
23.5. ВЭЖХ с перегретой водой.....	340
23.6. Электрохроматография.....	341

Глава 24. Приложение 1: прикладная теория ВЭЖХ	343
Глава 25. Приложение 2: как провести тестирование системы	353
25.1. Введение	353
25.2. Порядок проведения тестирования	353
25.3. Подготовка	354
25.4. Тестирование насоса	357
25.5. Тестирование УФ-детектора	361
25.6. Тестирование автосамплера	363
25.7. Тестирование термостата	363
25.8. Уравнения и вычисления	364
25.9. Протоколирование	365
Глава 26. Приложение 3: неисправности	366
26.1. Проблемы, связанные с давлением	366
26.2. Утечка в системе подачи подвижной фазы	368
26.3. Изменения/отклонения времен удерживания	368
26.4. Проблемы ввода образца	369
26.5. Проблемы, связанные с базовой линией	370
26.6. Проблемы, связанные с формой пика	371
26.7. Неисправности при работе с детекторами светорассеивания	373
26.8. Другие случаи	374
26.9. Поверка хроматографической системы	375
Глава 27. Приложение 4: упаковка колонки	376
Указатель разделений	380
Предметный указатель	382
О группе компаний «АНАЛИТ»	395
Аттестованные и внесенные в Госреестр методики, разработанные группой компаний «АНАЛИТ» для анализа в пищевой и технологической сферах	398

Предисловие к пятому изданию

Маленький юбилей! История этой книги началась тридцать лет назад с первого немецкого издания. Никто тогда и не думал о том, что это будет успешная история. Содержание книги омолаживается с каждым последующим изданием, чего, увы, нельзя сказать об авторе. На самом деле, последнее — не пожелание, а всего лишь шутка. Без сомнения, десятилетия общения с читателями пошли книге на пользу.

Включена новая тема: глава 20 рассказывает о контроле качества. Кое-что об этом можно прочесть в главе 19, но в настоящем издании тема освещена максимально широко и независимо от главы «Аналитическая ВЭЖХ». Два раздела в приложениях были обновлены и расширены Бруно И. Ленди, а именно раздел о тестировании хроматографической системы (в нынешнем издании это глава 25) и раздел о выявлении и устранении неисправностей (теперь глава 26). Были написаны некоторые новые разделы. В разделе 1.7 проводится сравнение ВЭЖХ с капиллярным электрофорезом; раздел 2.11 посвящен определению пиковой емкости. В разделе 8.7 рассмотрены кривые Ван-Деемтера и другие зависимости; в разделе 11.3 — хроматография гидрофильных взаимодействий. В разделе 17.2 приводятся рекомендации по передаче методики; раздел 18.4 посвящен комплексной двумерной ВЭЖХ, а раздел 23.3 — быстрым разделениям при давлении 1000 бар. В разделе 23.5 рассмотрена ВЭЖХ с перегретой водой.

Кроме того, многое доработано и добавлено большое количество ссылок.

Рискните отправиться в полную приключений страну ВЭЖХ! Вы получите удовлетворение, когда освоите и профессию, и ее теоретические основы.

Санкт-Галлен, июль 2009 г., Вероника Майер

Предисловие редактора перевода

Если книга выдержала пять изданий, то ее непременно нужно перевести. Так мы и поступили с книгой Вероники Майер «Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография». Надо сказать, что руководств для начинающих изучать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) издано к сегодняшнему дню не просто много, а очень много, но книга Вероники Майер подкупила нас простотой изложения и, что не менее важно, такими же простыми и понятными иллюстрациями, значительно облегчающими понимание излагаемого материала. Несомненное достоинство книги — множество практических задач, которые автор предлагает решить начинающему хроматографисту в ходе обучения. Безусловно, пятое издание книги отличается от первого тем, что оно расширено за счет современных методов и оборудования. Те места в тексте, где, по нашему мнению, не хватало информации о современном положении дел в ВЭЖХ или нужны были дополнительные разъяснения, мы снабдили примечаниями переводчиков и добавили ссылки на соответствующую литературу.

Пользуясь случаем, переводчики хотели бы поблагодарить И. В. Важенину за ценные замечания и помощь при подготовке рукописи перевода к печати.

К. т. н. М. Б. Бару

Важные и полезные формулы в ВЭЖХ

Это краткое изложение. Подробно уравнения обсуждаются в 2 и 8 главах.

Коэффициент удерживания:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}.$$

Коэффициент селективности α :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}.$$

Разрешение:

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{1/2_1} + w_{1/2_2}}.$$

Число теоретических тарелок:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 = 2\pi \left(\frac{h_p \cdot t_R}{A_p} \right)^2,$$
$$N \sim \frac{1}{d_p^2}.$$

Высота теоретической тарелки:

$$H = \frac{L_c}{N}.$$

Асимметрия, уширение заднего фронта пика:

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}} \quad \text{или} \quad T = \frac{w_{0,05}}{2f}.$$

Линейная скорость подвижной фазы:

$$u = \frac{L_c}{t_0}.$$

Общая пористость колонки:

$$\varepsilon = \frac{V_{\text{колонки}} - V_{\text{сорбента}}}{V_{\text{колонки}}}.$$

Линейная скорость подвижной фазы в случае, если $\varepsilon = 0,65$ (химически привитая неподвижная фаза):

$$u \text{ (мм/с)} = \frac{4F}{d_c^2 \cdot \pi \cdot \varepsilon} = 33 \frac{F \text{ (мл/мин)}}{d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)}}.$$

Время проскока в случае, если $\varepsilon = 0,65$:

$$t_0 \text{ (с)} = 0,03 \frac{d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)} \cdot L_c \text{ (мм)}}{F \text{ (мл/мин)}}.$$

Приведенная высота теоретической тарелки:

$$h = \frac{H}{d_p} = \frac{L}{N \cdot d_p}.$$

Приведенная скорость подвижной фазы:

$$v = \frac{u \cdot d_p}{D_m} = 1,3 \cdot 10^{-2} \frac{d_p \text{ (мкм)} \cdot F \text{ (мл/мин)}}{\varepsilon \cdot D_m \text{ (см}^2\text{/мин)} \cdot d_c^2 \text{ (мм)}}.$$

Приведенная скорость потока в нормальной фазе (гексан, образец с малой молекулярной массой, т. е. $D_m \approx 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2\text{/мин}$) в случае, если $\varepsilon = 0,8$:

$$v_{NP} = 6,4 \frac{d_p \text{ (мкм)} \cdot F \text{ (мл/мин)}}{d_c^2 \text{ (мм)}}.$$

Приведенная скорость потока в обращенной фазе (вода/ацетонитрил, образец с малой молекулярной массой, т. е. $D_m \approx 6 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2\text{/мин}$) в случае, если $\varepsilon = 0,65$:

$$v_{RP} = 33 \frac{d_p \text{ (мкм)} \cdot F \text{ (мл/мин)}}{d_c^2 \text{ (мм)}}.$$

Примечание: Оптимум скорости находится приблизительно при $v = 3$; таким образом, $h = 3$, что свидетельствует о хорошем качестве упаковки (для образца с малой молекулярной массой и хорошими массообменными свойствами).

Приведенное сопротивление потоку:

$$\Phi = \frac{\Delta p d_p^2 d_c^2 \pi}{4 L_c \eta F} = 4,7 \frac{\Delta p \text{ (бар)} \cdot d_p^2 \text{ (мкм}^2\text{)} \cdot d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)} \pi}{L_c \text{ (мм)} \cdot \eta \text{ (мПа} \cdot \text{с)} \cdot F \text{ (мл/мин)}}.$$

Примечание: $\Phi = 1000$ для должным образом упакованных колонок с незасоренными фильтрами.

$$\Delta p \sim \frac{1}{d_p^2}.$$

Общее время анализа:

$$t_{\text{общ}} = \frac{L_c d_p}{v D_m} (1 + k_n).$$

Общий расход растворителей:

$$V_{\text{общ}} = 0,25 L_c d_p^2 \pi \varepsilon (1 + k_n),$$

$$V_{\text{пос}} \sim d_c^2.$$

Объем пика:

$$V_{\text{пик}} = \frac{L_c d_c^2 \pi \varepsilon}{\sqrt{N}} (1 + k).$$

A_p	— площадь пика
$a_{0,1}$	— ширина передней части пика на высоте 10 % от общей высоты
$b_{0,1}$	— ширина задней части пика на высоте 10 % от общей высоты
d_c	— внутренний диаметр колонки
D_m	— коэффициент диффузии образца в подвижной фазе
d_p	— диаметр частиц неподвижной фазы
F	— объемная скорость потока подвижной фазы
f	— расстояние между фронтом пика и его максимумом на высоте $0,05h$
h_p	— высота пика
$k_{\text{пос}}$	— коэффициент емкости для последнего пика
t_R	— время удерживания
t_0	— время проскока
V	— объем
w	— ширина пика
$w_{1/2}$	— ширина пика на его полувывсоте
$w_{0,05}$	— ширина пика на высоте $0,05h$
η	— вязкость подвижной фазы
Δp	— перепад давления
L_c	— длина колонки

ГЛАВА I

ВВЕДЕНИЕ

I.1. ВЭЖХ: эффективный метод разделения

Эффективный метод разделения должен быть в состоянии справиться со смесью, содержащей большое число похожих растворенных веществ. На рис. 1.1 приведен пример такого разделения. Восемь бензодиазепинов могут быть разделены за 70 с.

Такая хроматограмма предоставляет непосредственно и качественную, и количественную информацию: у каждого соединения в смеси свое время элюции (момент, когда сигнал появляется на экране) при заданном наборе условий; площадь и высота каждого сигнала пропорциональны количеству соответствующего вещества.

Этот пример показывает, что *высокоэффективная жидкостная хроматография* (ВЭЖХ) и в самом деле очень эффективна, т.е. дает превосходное разделение за короткое время. «Изобретателям» современной хроматографии, Martin и Synge¹, еще в 1941 году было известно, что теоретически неподвижная фаза должна состоять из *очень мелких частиц*, и, следовательно, необходимо высокое давление для прокачивания *подвижной фазы* через колонку. Поэтому английское сокращение HPLC (high-performance liquid chromatography) — ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) иногда расшифровывают как «high-pressure liquid chromatography» — ЖХВД (жидкостная хроматография высокого давления)².

I.2. Первый эксперимент с ВЭЖХ

Несмотря на то что описанный здесь эксперимент прост, новичкам все же лучше было бы попросить помощи у опытного хроматографа.

Удобнее всего было бы использовать систему для ВЭЖХ с двумя емкостями для растворителей. Используйте воду и ацетонитрил. Оба растворителя надо профильтровать³ (через фильтр с порами <1 мкм) и дегазировать. Промойте систему чистым ацетонитрилом. После этого присоедините так называемую обращенно-фазовую колонку (октадецил, ODS или C₁₈), но можно также использовать

¹ A. J. P. Martin and R. L. M. Synge, *Biochem. J.*, **35**, 1358 (1941).

² В отечественной литературе в подавляющем большинстве случаев используется в качестве перевода аббревиатуры HPLC — ВЭЖХ, а не ЖХВД. — *Прим. пер.*

³ В настоящее время фильтруют только солевые буферы, приготовленные в лаборатории. Растворители «HPLC grade» не фильтруют. — *Прим. пер.*

и октильную или C_8 колонку), обращая при этом внимание на направление потока (обозначено на колонке стрелкой), и промывайте ее ацетонитрилом в течение примерно 10 мин. Расход растворителя зависит от диаметра колонки: 1–2 мл/мин для колонок с внутренним диаметром 4,6 мм, 0,5–1 мл/мин для 3-мм и 0,3–0,5 мл/мин для 2-мм колонок. Затем перейдите на смесь вода-ацетонитрил в соотношении 8:2 и снова промойте в течение 10–20 мин. Ультрафиолетовый детектор установите на 272 нм (впрочем, 254 нм тоже подойдет). Приготовьте кофе (только настоящий, а не без кофеина), возьмите небольшую порцию до того, как вы добавите молоко, сахар или подсластитель, и профильтруйте (<1 мкм). Как вариант можно использовать чай (тоже без добавок) или какой-нибудь прохладительный напиток с кофеином (лучше без сахара); эти напитки также надо профильтровать. Введите 10 мкл образца. Появится хроматограмма, сходная с изображенной на рис. 1.2. Обычно последний большой пик и есть сигнал кофеина. Если он слишком высок, вводите меньше образца, и наоборот. Кроме того,

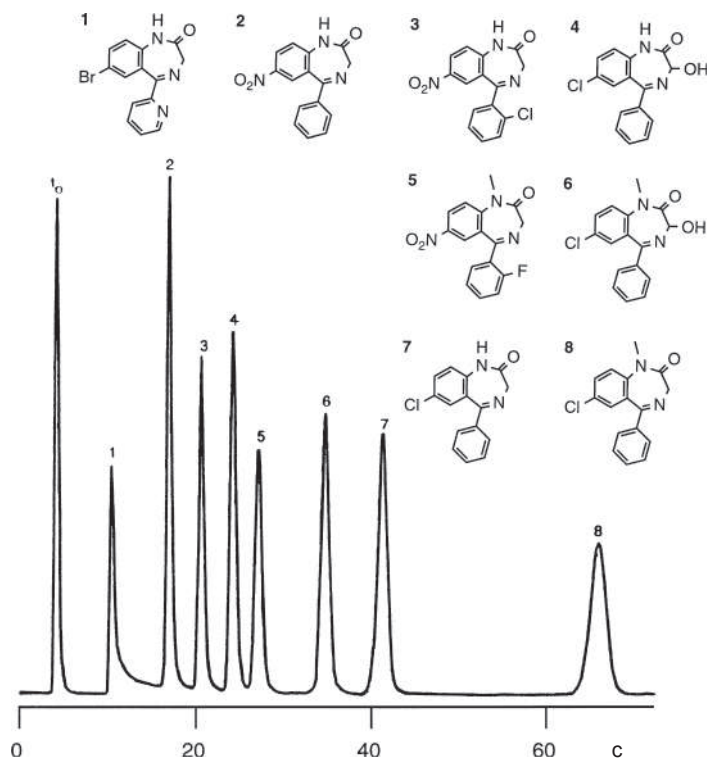


Рис. 1.1. ВЭЖХ разделение бензодиазепинов (T. Welsch, G. Mayr and N. Lammers, *Chromatography*, InCom Sonderband, Düsseldorf, 1997, p. 357). Условия: по 40 нг каждого образца; колонка: 30×4,6 мм; неподвижная фаза: ChromoSphere UOP C18, 1,5 мкм (непористая); подвижная фаза: 3,5 мл/мин вода-ацетонитрил (85:15); температура: 35 °C; УФ, 254 нм. Пики: 1 — бромазепам; 2 — нитразепам; 3 — хлоразепам; 4 — оксазепам; 5 — флунифразепам; 6 — гидроксидиазепам (темазепам); 7 — десметилдиазепам (нордеазепам); 8 — диазепам (валиум)

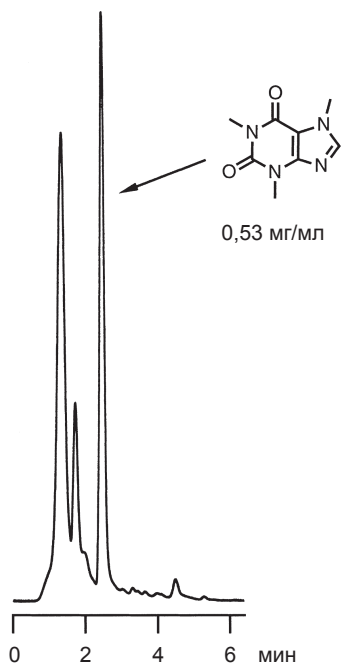


Рис. 1.2. ВЭЖХ разделение кофе. Условия: колонка, 150×2 мм, неподвижная фаза, YMC 120ODS-AQ, 3 мкм; скорость потока 0,3 мл/мин, вода-ацетонитрил (8:2); УФ, 272 нм

можно настроить чувствительность детектора. Рекомендуется выбирать объем образца, который дает величину пика кофеина не больше одной единицы поглощения (1 AU) по показаниям детектора. Если пик элюируется поздно, скажем, позднее, чем через 10 мин, следует увеличить содержание ацетонитрила в подвижной фазе (попробуйте смесь вода-ацетонитрил в соотношении 6:4). Если же пик кофеина элюируется слишком рано и плохо разрешается с другими пиками в самом начале хроматограммы, следует уменьшить содержание ацетонитрила (например, 9:1).

Пик кофеина можно проинтегрировать и, таким образом, количественно определить его содержание в вашем напитке. Приготовьте несколько калибровочных растворов кофеина в подвижной фазе, например в диапазоне 0,1–1,0 мг/мл, и проанализируйте их. Для количественного анализа можно использовать площади пиков или их высоты. Калибровочный график должен быть линейным и проходить через начало координат. Содержание кофеина в напитках может изменяться в широких пределах, и величина 0,53 мг/мл, показанная на рис. 1.2, всего лишь отражает вкусы автора.

После завершения работы снова промойте колонку чистым ацетонитрилом.

1.3. Виды разделений в жидкостной хроматографии

Адсорбционная хроматография

Принцип адсорбционной хроматографии (нормально-фазовой хроматографии) известен из классической колоночной и тонкослойной хроматографии. Относительно полярный материал с высокой удельной площадью поверхности используется как неподвижная фаза. Наиболее популярен силикагель, также часто используются оксиды алюминия и магния. Подвижная фаза относительно неполярна (от гептана к тетрагидрофурану). Разная степень, с которой молекулы различных типов, содержащиеся в смеси, адсорбируются на неподвижной фазе, дает эффект разделения. Неполярный растворитель, такой как гексан, элюирует медленнее, чем растворитель средней полярности, например эфир.

Общее правило: полярные соединения элюируются позже, чем неполярные.

Примечание. Полярные означает водорастворимые, гидрофильные; неполярные — синоним жирорастворимых, липофильных.

Обращенно-фазовая хроматография

В противоположность сказанному выше для нормально-фазовой хроматографии:

- а) неподвижная фаза очень неполярная;
- б) подвижная фаза относительно полярная (от воды до тетрагидрофурана);
- в) полярный растворитель, такой как вода, элюирует медленнее, чем менее полярный растворитель, такой как ацетонитрил.

Общее правило: неполярные соединения элюируются позже, чем полярные.

Хроматография на химически связанных фазах

Неподвижная (стационарная) фаза ковалентно связана со своей подложкой с помощью химической реакции. Тщательно подбирая реагенты, можно получить огромное число стационарных фаз. Описанная выше обращенно-фазовая хроматография представляет собой наиболее важный случай хроматографии на химически привитой фазе.

Ионообменная хроматография

Стационарная фаза содержит ионные группы (например, NR_3^+ или SO_3^-), которые взаимодействуют с ионными группами молекул образца. Этот метод подходит для разделения аминокислот, ионных продуктов метаболизма и органических ионов.

Ион-парная хроматография

Ион-парная хроматография также может быть использована для разделения ионных соединений. Кроме того, она устраняет некоторые трудности, присущие ионообменной хроматографии. Ионные молекулы образца «маскируются» подходящим противоионом. Основные преимущества метода — возможность использовать широко доступные обращенно-фазовые системы (при этом можно обойтись без ионообменников) и возможен одновременный анализ кислот, оснований и нейтральных веществ.

Ионная хроматография

Ионная хроматография была разработана как средство разделения ионов сильных кислот и оснований (например, Cl^- , NO_3^- , Na^+ , K^+). Это особый случай ионообменной хроматографии, требующий, однако, другого оборудования.

Эксклюзионная хроматография

Этот вид можно подразделить на гель-проникающую хроматографию (с органическими растворителями) и гель-фильтрацию (с водными растворами).

Эксклюзионная хроматография разделяет молекулы по размеру, т.е., в соответствии с молекулярной массой. Самые большие молекулы элюируются

первыми, а самые маленькие — последними. Этот метод стоит выбирать, когда смесь содержит соединения с разницей молекулярных масс по крайней мере в 10 %¹.

Аффинная хроматография

В этом случае разделение обеспечивается за счет высокоспецифических биохимических взаимодействий. Неподвижная фаза содержит специфические группы молекул, которые могут адсорбировать только образцы, удовлетворяющие определенным пространственным условиям и распределению заряженных групп (сравните с взаимодействием между антигенами и антителами). Аффинная хроматография может быть использована для выделения белков (как ферментов, так и структурных белков), липидов и т.д. из сложных смесей без привлечения больших затрат.

1.4. Хроматографическая система для ВЭЖХ

Система для ВЭЖХ может представлять собой набор индивидуальных модулей или элементов либо быть сконструированна как единый моноблок. Модульный подход более гибок в случае отказа одного из компонентов. Более того,

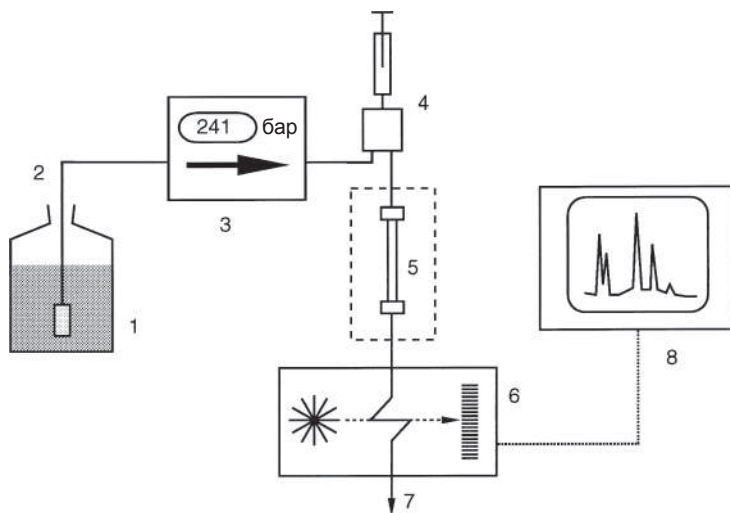


Рис. 1.3. Схематическое изображение системы для ВЭЖХ. 1 — резервуар для растворителя; 2 — линия подачи элюента с входным фильтром; 3 — насос (с манометром); 4 — устройство ввода образца; 5 — колонка (с термостатом); 6 — детектор; 7 — слив; 8 — устройство сбора и обработки данных

¹ Это довольно спорное утверждение. Если мы хотим получить разделение до базовой линии, то эта разница должна быть куда как существеннее и находиться в интервале от 70 до 100 %. См.: *HPLC of Peptides and Proteins. Methods and Protocols*. Ed. by Marie-Isabel Aguilar 2004 Humana Press Inc. p. 65. — *Прим. пер.*



индивидуальные составляющие не обязательно должны быть от одного и того же производителя. Если же вам не нравится выполнять мелкий ремонт самостоятельно, то вам подойдет моноблок. На рабочем столе, однако, он занимает столько же места, как и модульная установка.

На рис. 1.3 показаны части, из которых состоит простейшая система для ВЭЖХ: резервуар для растворителя, линия подачи элюента с входным фильтром, насос высокого давления, устройство ввода образца (инжектор), колонка, детектор и устройство сбора и обработки данных. Хотя колонка является самой важной частью системы, обычно она и самая маленькая ее часть. Для проведения разделений при определенной температуре ее помещают в термостат. Обычно работают более чем с одним растворителем, а значит, нужны смеситель и блок управления. Если сбор данных выполняется компьютером, то его же можно использовать и для управления всей системой.

1.5. Безопасность в хроматографической лаборатории

ВЭЖХ присущи три фактора, вредные для здоровья:

- а) токсичные растворители;
- б) раздражение дыхательных путей вследствие вдыхания неподвижной фазы;
- в) опасности, вызванные высоким давлением.

Краткосрочные и долгосрочные риски воздействия растворителей и паров в основном известны, но им уделяют слишком мало внимания. Следует делать во всех пластиковых крышках питающих и сливных емкостей отверстия минимального размера, достаточные лишь для того, чтобы в них проходили тефлоновые капилляры для заполнения или опорожнения этих емкостей. При этом токсичные пары не проникают в атмосферу лаборатории и никакие загрязнения не попадают в высокоочищенный растворитель. Всю работу с растворителями следует выполнять только в условиях хорошей вентиляции.

То обстоятельство, что частицы размером 5 мкм и менее, используемые в ВЭЖХ, могут попасть в легкие (они не задерживаются в бронхах и пролетают насквозь), менее известно, и потенциальная долгосрочная опасность еще должным образом не изучена. Аморфный силикагель, используемый в качестве неподвижных фаз, сам по себе не опасен¹, но тем не менее вдыхания его следует избегать. В качестве меры предосторожности любые операции, при которых возможно распространение пыли неподвижной фазы (открытие пузырьков, взвешивание и т. д.), следует выполнять в вытяжном шкафу.

Насос высокого давления не так уж и опасен. В противоположность газам, жидкости почти несжимаемы (примерно 1 % объема на 100 бар). Таким образом, жидкость содержит очень мало энергии, даже в условиях высокого давления. Струя жидкости может вытечь через неисправное соединение, но при этом отсутствует опасность взрыва. Однако эта жидкость может причинить телу

¹ C. J. Jonston *et al.* *Toxicol. Sci.*, **56**, 405 (2000).

серьезный физический вред. Колонна под давлением, открытая снизу с целью опорожнения, не должна ничем перекрываться. Настоятельно рекомендуется к прочтению описание несчастного случая, вызванного подобного рода действиями¹.

1.6. Сравнение высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии

Подобно ВЭЖХ, газовая хроматография² (ГХ) также является высокоэффективным методом. Наиболее важное различие между этими двумя методами состоит в том, что с помощью ГХ можно анализировать только либо летучие соединения, либо соединения, которые устойчивы при испарении при повышенной температуре, либо соединения, из которых можно надежно получать летучие производные. Только около 20 % известных органических соединений можно проанализировать с помощью газовой хроматографии без предварительной обработки. Для жидкостной хроматографии образец должен быть растворен в растворителе, и, за исключением поперечно сшитых высокомолекулярных соединений, все органические и ионные неорганические вещества удовлетворяют этому условию.

Таблица 1.1. Сравнение ГХ и ВЭЖХ

Задача	ГХ	ВЭЖХ
Сложное разделение	Возможно	Возможно
Скорость	Да	Да
Автоматизация	Возможна	Возможна
Приспособление системы к задаче разделения	Посредством изменения состава неподвижной фазы	Посредством изменения подвижной и неподвижной фаз
Ограничение применения	Недостаток летучести, разрушение при нагревании	Нерастворимость
Обычно получаемое число теоретических тарелок	В расчете на колонку	В расчете на метр
ГХ с набивными колонками	2000	1000
ГХ с капиллярными колонками	50 000	3000
Классическая жидкостная хроматография	100	200
ВЭЖХ	5000	50 000

¹ G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, **189**, 108 (1980).

² H. M. McNair, J. M. Miller and F. A. Settle, *Basic Gas Chromatography*, Wiley-Interscience, New York, 2009.

Сопоставление характеристик этих двух методов представлено в табл. 1.1. По сравнению с газовой хроматографией имеются три важных отличия:

а) коэффициент диффузии образца в подвижной фазе в условиях ВЭЖХ значительно меньше, чем в условиях ГХ (это является недостатком, поскольку коэффициент диффузии является важнейшим фактором, определяющим скорость хроматографического анализа);

б) вязкость подвижной фазы в случае ВЭЖХ выше, чем в случае ГХ (это тоже недостаток, поскольку высокая вязкость приводит к малым коэффициентам диффузии и высокому сопротивлению потоку подвижной фазы);

в) сжимаемость подвижной фазы под действием давления пренебрежимо мала в случае ВЭЖХ, чего нельзя сказать о ГХ (это является преимуществом ВЭЖХ, потому что вследствие этого скорость потока подвижной фазы постоянна по всей длине колонки. Следовательно, если скорость потока выбрана верно, то оптимальные условия для хроматографического разделения наблюдаются по всей длине колонки. Более того, ввиду несжимаемости жидкость под высоким давлением не опасна).

1.7. Сравнение высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза

Капиллярный электрофорез¹ (также называемый капиллярным зонным электрофорезом, КЗЭ) подходит для электрически заряженных анализируемых веществ и разделяет их, попросту говоря, в соответствии с отношением их заряда к размеру. К тому же форма молекулы является еще одним фактором, влияющим на скорость миграции, что делает возможным разделение изомеров, а также анализируемых веществ с одинаковым удельным зарядом. Катионы (положительно заряженные молекулы) движутся быстрее, чем анионы (отрицательно заряженные молекулы), и появляются в детекторе раньше. Маленькие многозарядные катионы являются самыми быстрыми частицами, в то время как маленькие многозарядные анионы — самыми медленными.

Разделение происходит под действием высокого напряжения. Между концами разделяющего капилляра прикладывают электрическое поле напряжением до 30 кВ. Как следствие, буферный раствор в капилляре движется в сторону отрицательно заряженного катода. Капилляры имеют длину 20–100 см и внутренний диаметр 50–250 мкм. В противоположность ВЭЖХ-колонкам они не упакованы неподвижной фазой в «хроматографическом» понимании этого процесса, но в некоторых случаях заполнены гелем, который делает возможным разделение веществ по размеру их молекул (как и в эксклюзионной хроматографии).

Эффективность разделения может быть на несколько порядков выше, чем в ВЭЖХ (до 10^7 теоретических тарелок), делая капиллярный электрофорез исключительно ценным методом для пептидного картирования или секвенирования ДНК. Впрочем, можно разделять и малые молекулы, такие как аминокислоты или неорганические ионы. Из-за малого объема капилляра можно ввести лишь

¹ P. Schmitt-Kopplin, *Capillary Electrophoresis*, Humana Press, Totowa, 2008; S. Wren, *Chromatographia Suppl.*, **54**, S-15 (2001).

небольшое абсолютное количество образца. Главным недостатком, по сравнению с количественной ВЭЖХ, является более низкая воспроизводимость (точность). Кроме того, невозможно выполнение препаративных разделений.

Электрoхроматография (см. раздел 23.6) является гибридом ВЭЖХ и КЭ. Для этого метода капилляры упаковывают неподвижной фазой, а разделение основывается на явлении распределения. Подвижная фаза действует как при капиллярном электрофорезе; она состоит из буферного раствора и движется благодаря приложенному электрическому полю.

1.8. Единицы измерения давления, длины и вязкости

Единицы измерения давления

Обычной единицей измерения давления в ВЭЖХ является бар, но в единицах СИ — паскаль (Па). $1 \text{ Па} = 1 \text{ Н/м}^2$. Атмосферы (Атм или ат) использовать более не следует. Американская единица psi (фунт на квадратный дюйм) используется по-прежнему. Обратите внимание на разницу между $\text{psia} = \text{psi}$ (абсолютное) и $\text{psig} = \text{psi gauge}$ (по манометру). Последняя величина означает избыточное давление по сравнению с атмосферным.

$$1 \text{ бар} = 10^5 \text{ Па} = 10^5 \text{ кг} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{с}^{-2} = 0,987 \text{ атм} = 1,02 \text{ ат} = 14,5 \text{ psi}$$

Пересчет:

$$1 \text{ МПа} = 10 \text{ бар (мегапаскаль)}$$

$$1 \text{ бар} = 1,013 \text{ бар (физическая атмосфера)}$$

$$1 \text{ ат} = 0,981 \text{ бар (техническая атмосфера, } 1 \text{ кгс/см}^2\text{)}$$

$$1 \text{ psi} = 0,0689 \text{ бар}$$

Общее правило:

$$1000 \text{ psi} \approx 70 \text{ бар}, 100 \text{ бар} = 1450 \text{ psi}.$$

Единицы длины

Для обозначения диаметров трубопроводов или капилляров в ВЭЖХ используется английская мера длины дюйм (in или "). Меньшие единицы выражают не десятными долями, а $1/2$, $1/4$, $1/8$ или $1/16$ либо кратными им величинами.

Внешние диаметры:

$$1" = 25,40 \text{ мм} \quad 1/2" = 12,70 \text{ мм} \quad 3/8" = 9,525 \text{ мм} \quad 1/4" = 6,35 \text{ мм}$$

$$3/16" = 4,76 \text{ мм} \quad 1/8" = 3,175 \text{ мм} \quad 1/16" = 1,59 \text{ мм}$$

Внутренние диаметры капилляров:

$$0,04" = 1,0 \text{ мм} \quad 0,02" = 0,51 \text{ мм} \quad 0,01" = 0,25 \text{ мм} \quad 0,007" = 0,18 \text{ мм}$$

Единицы вязкости

Единица СИ для динамической вязкости — паскаль на секунду: $1 \text{ Па} \cdot \text{с} = 1 \text{ кг} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Вязкости растворителей составляют около $1 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с} = 1 \text{ мПа} \cdot \text{с}$. Ранее использовалась единица сантипуаз: $1 \text{ мПа} \cdot \text{с} = 1 \text{ сП}$.

1.9. Научные журналы

Journal of Chromatography A (все вопросы хроматографии) ISSN 0021-9673.

Journal of Chromatography B (биомедицинские науки и приложения) ISSN 1570-0232.

До тома 651 (1993) это был один журнал, в котором некоторые тома были посвящены биомедицинским приложениям. После 1993 г. журнал был разделен и продолжал выпускаться в виде отдельных томов, имеющих одинаковые номера, но разные буквы (например, 652A и 652B). Elsevier Science, P.O. Box 211, NL-1000AE Amsterdam, The Netherlands.

Journal of Chromatographic Science, ISSN 0021-9665, Preston Publications, 6600 W. Touhy Avenue, Niles, IL 60714-4588, USA.

Chromatographia, ISSN 0009-5893, Vieweg Publishing, P.O. Box 5829, D-65048, Wiesbaden, Germany.

Journal of Separation Science (до 2001 г. *Journal of High Resolution Chromatography*), ISSN 1615-9306, Wiley-VCH, P.O. Box 10 11 61, D-69451 Weinheim, Germany.

Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, ISSN 1082-6076, Marcel Dekker, 270 Madison Avenue, New York, NY 10016-0602, USA.

LC GC Europe (бесплатно в Европе, ранее назывался LC GC International), ISSN 1471-6577, Advanstar Communications, Advanstar House, ParkWest, Sealand Road, Chester CH1 4RN, UK.

LC GC North America (бесплатно в США, ранее назывался LC GC Magazine), ISSN 0888-9090, Advanstar Communications, 859 Willamette Street, Eugene, OR, 97401, USA.

LC GC Asia Pacific (бесплатно в Азиатско-Тихоокеанском регионе), Advanstar Communications, 101 Pacific Plaza, 1/F, 410 Des Voeux Road West, Hong Kong, People's Republic of China.

Biomedical Chromatography, ISSN 0269-3879, John Wiley & Sons, Ltd, 1 Oldlands Way, Bognor Regis PO22 9SA, UK.

International Journal of Bio-Chromatography, ISSN 1068-0659, Gordon and Breach, P.O. Box 32160, Newark, NJ 07102, USA.

Separation Science and Technology, ISSN 0149-6395, Taylor & Francis, Mortimer House, 37–41 Mortimer Street, London, W1T 3JH, UK.

Chromatography Abstracts, ISSN 0268-6287, Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge CB4 0WF, UK.

The Journal of Microcolumn Separations (John Wiley & Sons, Ltd, ISSN 1040-7865) был объединен с *The Journal of Separation Science* после номера 8 том 13 (2001).

1.10. Рекомендованные книги

J. W. Dolan and L. R. Snyder, *Troubleshooting LC Systems*, Aster, Chester, 1989.

M. W. Dong, *Modern HPLC for Practicing Scientists*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2006.

N. Dyson, *Chromatographic Integration Methods*, Royal Society of Chemistry, London, 2nd ed., 1998.

S. Kromidas, ed., *HPLC Made to Measure*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.

- H. J. Kuss and S. Kromidas, *Quantification in LC and GC*, Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- V. R. Meyer, *Pitfalls and Errors of HPLC in Pictures*, Wiley-VCH, Weinheim, 2nd ed., 2006.
- S. C. Moldoveanu and V. David, *Sample Preparation in Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2002.
- U. D. Neue, *HPLC Columns — Theory, Technology, and Practice*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
- H. Posch and B. Trathnigg, *HPLC of Polymers*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1998.
- P. C. Sadek, *Troubleshooting LC Systems*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999.
- L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 3rd ed., 2010.
- L. R. Snyder and J. W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, Wiley-Interscience, Hoboken, 2007.
- L. R. Snyder, J. J. Kirkland and J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, Wiley-Interscience, New York, 2nd ed., 1997.

Основные учебники по хроматографии

- E. Heftmann, ed., *Chromatography, Part A: Fundamentals and Techniques, Part B: Applications*, Elsevier, Amsterdam, 6th ed., 2004.
- J. M. Miller, *Chromatography — Concepts and Contrasts*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2nd ed., 2009.
- C. F. Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2002.
- K. Robards, P. E. Jackson and P. R. Haddad, *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, Academic, London, San Diego, 1995.

ГЛАВА 2

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ

2.1. Хроматографический процесс

Определение

Хроматография — это процесс разделения, в ходе которого смесь образца распределяется между двумя фазами в хроматографическом слое (колонке или на пластине). Одна из фаз является неподвижной, в то время как другая протекает сквозь этот хроматографический слой. В качестве *неподвижной фазы* используют твердые, пористые, поверхностно-активные частицы либо тонкую пленку жидкости, нанесенную на твердую подложку или стенку колонки. *Подвижной фазой* может быть газ или жидкость. Если в разделении применяют газ, то процесс называется газовой хроматографией. Во всех остальных видах хроматографии, включая тонкослойную хроматографию, всегда используется жидкость.

Эксперимент: разделение тестовых красителей

«Классическую» хроматографическую колонку длиной 20 см с краном (или стеклянную трубку диаметром 2 см с сужающимся нижним концом, снабженным капилляром с зажимом) наполняют суспензией силикагеля в толуоле. После оседания силикагеля в колонке с помощью шприца наносят на сорбент примерно 50–100 мкл раствора красителя (например, тестовая смесь красителей II N, произведенная фирмой Camag, Муттенц, Швейцария) и элюируют толуолом.

Наблюдения

Разные красители перемещаются по колонке с разной скоростью. Различают шесть зон: жирный красный 7B, желтый судан, черный судан (два компонента), жирный оранжевый и артизил синий 2RP. Вещества, проявляющие сродство к элюенту, перемещаются по колонке быстрее по сравнению с веществами, родственными сорбенту.

Преимущественное нахождение вещества в одной из фаз можно выразить *коэффициентом распределения K*:

$$K_x = \frac{C_{\text{непод}}}{C_{\text{под}}},$$

где $c_{\text{непод}}$ — концентрация (действительная активность) вещества X в неподвижной фазе, $c_{\text{под}}$ — концентрация вещества X в элюенте, или коэффициентом удерживания k (ранее называемым коэффициентом емкости k'):

$$k_x = \frac{n_{\text{непод}}}{n_{\text{под}}},$$

где $n_{\text{непод}}$ — количество молей вещества X в неподвижной фазе, $n_{\text{под}}$ — количество молей X в элюенте. Очевидно, что сорбент и элюент должны находиться в тесном контакте друг с другом, чтобы обеспечить равномерное распределение.

Вещества, которые должны быть разделены, должны иметь разные коэффициенты распределения и, следовательно, различные коэффициенты удерживания в хроматографической системе.

Графическое изображение процесса разделения

- На колонке разделяют смесь двух веществ, \blacktriangle и \bullet (рис. 2.1а).
- Вещество \blacktriangle проявляет большее сродство к сорбенту, а вещество \bullet — к подвижной фазе (рис. 2.1б). Здесь $k_{\blacktriangle} = 5/2 = 2,5$ и $k_{\bullet} = 2/5 = 0,4$.

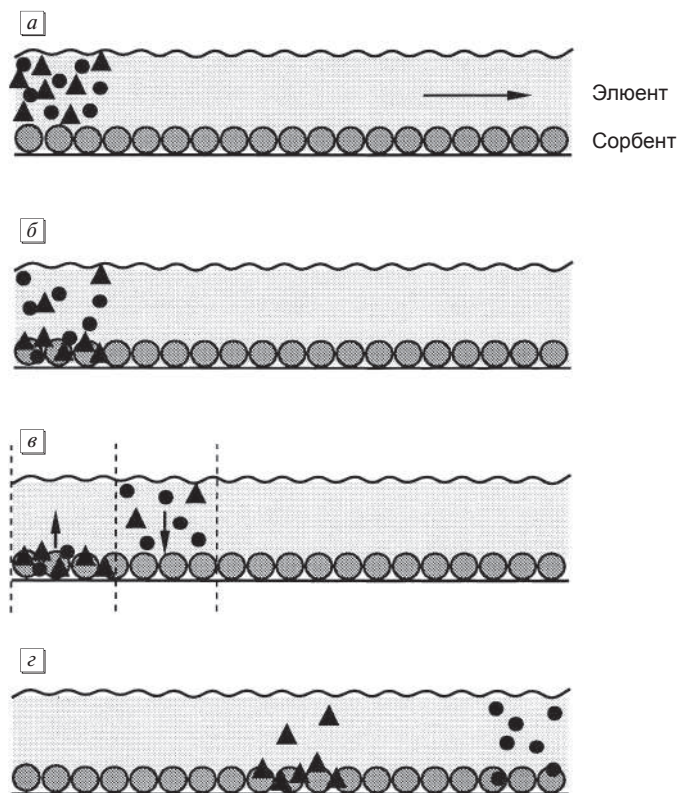


Рис. 2.1. Изображение хроматографического разделения

- в) Новое равновесие наступает по мере поступления свежего элюента: молекулы образца в подвижной фазе частично адсорбируются в соответствии с их коэффициентами распределения на поверхности неподвижной фазы. Между тем, как молекулы, которые до этого были адсорбированы, вновь возвращаются в поток элюента (рис. 2.1в)
- г) В результате многократного повторения процесса адсорбции-десорбции происходит разделение двух веществ. Вещество •, проявляющее сродство к элюенту, перемещается по колонке быстрее по сравнению с веществом ▲, которое склонно «застревать» на сорбенте (рис. 2.1г).

На рис. 2.1 видно, что вдоль зоны, соответствующей $3\frac{1}{2}$ диаметра частиц сорбента, установилось новое равновесное состояние. Это расстояние называется *теоретической тарелкой*. Чем больше слой сорбента в колонке, тем больше теоретических тарелок в ней содержится, а значит, выше степень разделения смеси. Этот эффект частично нивелируется *размыванием зоны*. Эксперименты показали: чем больше пройденное расстояние в колонке и длительнее время удерживания, тем сильнее размывается зона вещества.

2.2. Размывание зоны

Существует множество причин размывания зон. Важно их понимать, чтобы само явление свести к минимуму и в результате колонка сохранила бы как можно большее число теоретических тарелок.

Первая причина: турбулентная диффузия

Колонки упаковывают мелкозернистым сорбентом. Когда элюент проходит между частицами сорбента, он переносит молекулы образца (рис. 2.2). Некоторые из них «счастливчики» — они покидают колонку быстрее всех, так как траектория их движения в ней в первом приближении напоминает прямую линию. Другие молекулы элюируются позднее, поскольку их путь далек от идеального и имеет множественные отклонения.

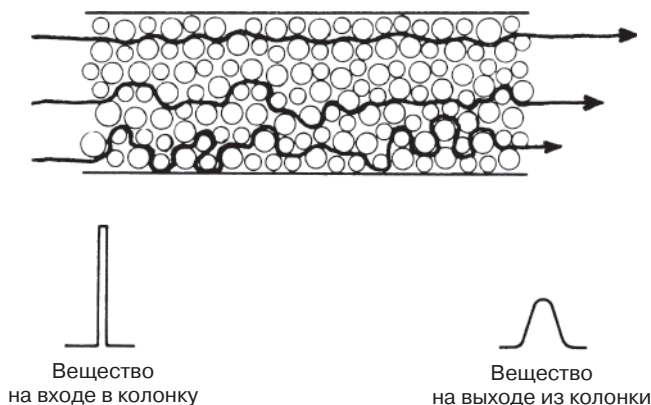


Рис. 2.2. Турбулентная диффузия в хроматографической колонке

Вторая причина: распределение потока

Поток элюента, проходящий между частицами сорбента, ламинарный (рис. 2.3). Скорость потока в каналах между частицами сорбента в середине выше, чем в приповерхностной области. На рис. 2.3 стрелками указана скорость подвижной фазы (чем длиннее стрелка, тем выше скорость потока). Турбулентную диффузию и распределение потока можно снизить, упаковав колонку сорбентом с одинаковым размером частиц.

Первое правило эффективной колонки основывается на том, что колонка должна быть упакована сорбентом узкого фракционного состава. Соотношение диаметров самых крупных и самых мелких частиц не должно превышать 2,0, а еще лучше 1,5 (например, диаметр самых маленьких частиц 5,0 мкм, а самых больших — 7,5 мкм).

Размывание, вызванное турбулентной диффузией и распределением потока, мало зависит, если вообще зависит, от скорости подвижной фазы.

Третья причина: диффузия молекул образца в подвижной фазе

Молекулы образца распространяются в растворителе без внешнего воздействия (так же как кусок сахара растворяется в воде даже без перемешивания). Это происходит из-за продольной диффузии (рис. 2.4), которая отрицательно влияет на высоту теоретической тарелки в случае, если:

- а) размер частиц сорбента мал;
 - б) слишком низкая скорость элюента по отношению к диаметру частиц;
 - в) относительно большой коэффициент диффузии образца,
- и все это одновременно имеет место в хроматографической системе.

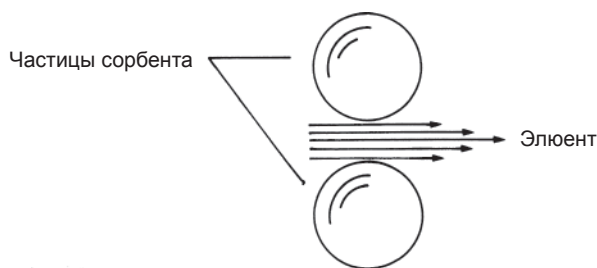


Рис. 2.3. Распределение потока в хроматографическом слое



Рис. 2.4. Размывание зоны, вызванное продольной диффузией. Слева показана зона вещества сразу после ввода. В пространстве она будет распределяться по трем осям координат (стрелками указаны направления). Справа показана зона вещества через какое-то время. Перемещаясь с потоком элюента, объем зоны увеличивается из-за диффузии

Второе правило — скорость элюента рекомендуется выбирать таким образом, чтобы продольная диффузия не оказывала отрицательного влияния. Это происходит, когда $u > 2D_m/d_p$, где u — линейная скорость потока элюента, D_m — коэффициент диффузии образца в подвижной фазе, d_p — диаметр частиц сорбента. Более подробно этот материал изложен в разделе 8.5.

Четвертая причина: массоперенос между подвижной, «застойной» и неподвижной фазами

На рис. 2.5 изображена структура частицы неподвижной фазы, в которой встречаются узкие и широкие каналы. Некоторые из них проходят сквозь всю частицу, а некоторые не имеют выхода.

Поры заполнены элюентом, который не движется в них (застаивается). Молекула образца, попадая в пору¹, не переносится потоком растворителя, и изменить свое положение она может только благодаря диффузии. При этом существует два варианта событий.

- а) Обратная диффузия молекулы в поток подвижной фазы. Этот процесс требует времени, в течение которого молекулы, не удерживаемые



Рис. 2.5. Пористая структура частицы сорбента

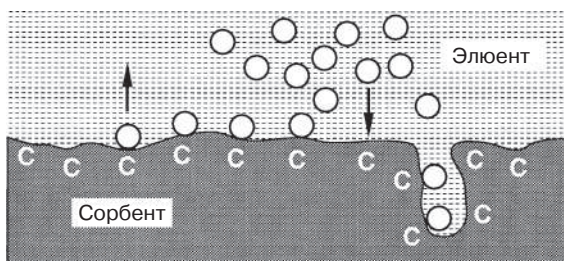


Рис. 2.6. Массоперенос между подвижной и неподвижной фазами. У сорбента есть «адсорбционные» центры С (в широком смысле), притягивающие молекулы образца. Молекулы образца адсорбируются на этих центрах (средняя часть рисунка) и десорбируются (слева) с них. Доступ к центрам, находящимся в порах, более затруднителен, поэтому десорбция идет медленнее (справа)

¹ Молекулы могут и вовсе не попасть в поры. — Прим. пер.

в порах, передвигаются чуть дальше. Чем короче поры (т. е. меньше частицы сорбента), тем уже полоса вещества на выходе из колонки. Кроме того, скорость диффузии молекул вещества в растворитель обратно пропорциональна вязкости среды, т. е. в менее вязком растворителе молекулы быстрее диффундируют внутрь пор и из них.

- б) Молекула взаимодействует непосредственно с самой неподвижной фазой (адсорбентом или жидкой пленкой) и адсорбируется. Она на некоторое время «залипает» на неподвижной фазе, а затем снова проникает внутрь «застойной» фазы. В этом случае процесс массообмена отличается длительностью (рис. 2.6).

В обоих случаях размывание зоны вещества увеличивается с ростом скорости элюента: молекулы образца, не адсорбировавшиеся на неподвижной фазе, смещаются дальше от молекул, попавших в поры. Чем выше скорость потока, тем сильнее происходит размывание зоны, но затрачиваемое время на элюцию вещества уменьшается.

Третье правило: в качестве неподвижной фазы рекомендуется использовать мелкие частицы или частицы с тонким пористым поверхностным слоем.

Четвертое правило: рекомендуется работать с менее вязкими растворителями.

Пятое правило: чем выше скорость анализа, тем хуже разрешение, и наоборот. Однако это правило применимо для крупных, а не для мелкозернистых сорбентов.

Высота теоретической тарелки H зависит от скорости потока подвижной фазы u (рис. 2.7)¹. При этом кривую H/u называют кривой Ван-Деемтера. Значение оптимальной скорости потока $u_{\text{опт}}$ зависит от свойств анализируемого вещества.

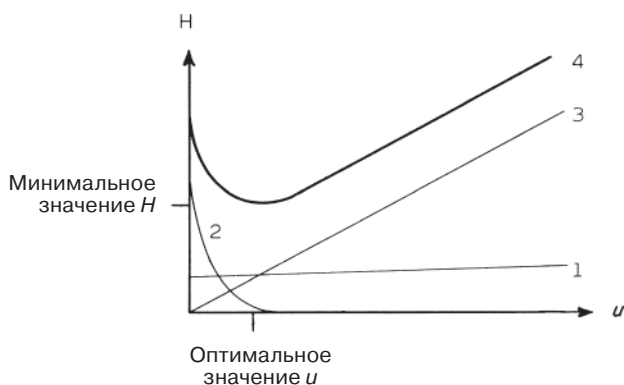


Рис. 2.7. Кривая Ван-Деемтера (кривая H/u). 1 — турбулентная диффузия и размывание зоны вещества под воздействием потока; 2 — продольная диффузия вещества. В жидкостной хроматографии следует использовать такие скорости потока, при которых продольная диффузия не имеет какого-либо существенного значения. 3 — массообмен вещества: угол наклона больше для 50-мкм частиц, чем для 5-мкм частиц; 4 — полученная кривая Ван-Деемтера (кривая H/u)

¹ J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg and A. Klinkenberg, *Chem. Eng. Sci.*, **5**, 271 (1956).

2.3. Хроматограмма и ее суть

Вещества, перемещаясь по колонке с потоком элюента, попадают в детектор, который регистрирует их в виде Гауссовой (в форме колокола) кривой¹. Сигналы называют пиками (рис. 2.8), а совокупность всех пиков образца представляет собой хроматограмму.

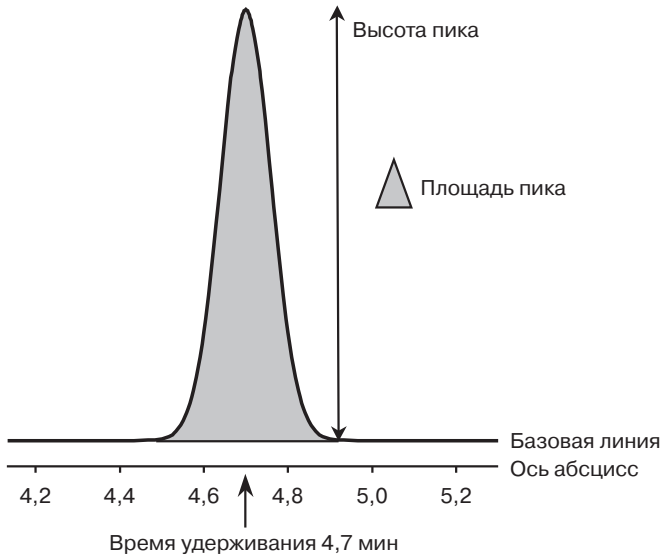
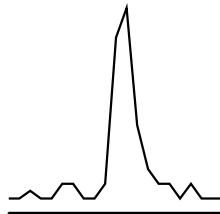


Рис. 2.8. Форма пика

Из хроматограммы можно получить качественную и количественную информацию о пробе.

- а) *Качественная информация.* В одних и тех же хроматографических условиях время удерживания вещества постоянно. Время удерживания — это промежуток времени между вводом образца и регистрацией максимального значения сигнала. Такие параметры, как геометрия колонки, тип сорбента, состав подвижной фазы, скорость потока, масса пробы и температура, составляют хроматографические условия. Следовательно, идентифицировать тот или иной пик можно, проанализировав соответствующий образец и сравнив времена удерживания.

¹ При использовании масс-детектора форма пика может быть искажена из-за низкой скорости передачи данных. Количественный анализ будет носить приблизительный характер.



- б) *Количественная информация.* Площадь, так же как и высота пика, пропорциональна массе анализируемого вещества. Для построения калибровочного графика необходимы площади и высота пиков, полученных во время анализа разных растворов с точно известной концентрацией. По этому графику можно определить концентрацию вещества в растворе, сравнив размеры пиков.

По хроматограмме можно оценить эффективность разделения (рис. 2.9).

Здесь w — ширина пика на уровне базовой линии¹, t_0 — *мертвое время*, или время выхода неудерживаемых веществ, т. е. время, за которое элюент проходит весь объем колонки (также называемое *временем проскока*). Значит, линейную скорость потока u можно определить по уравнению:

$$u = \frac{L}{t_0},$$

где L — длина колонки. Неудерживаемые вещества, т. е. те, которые не удерживались на стационарной фазе, регистрируются на хроматограмме при t_0 . t_R — *время удерживания*² — промежуток времени между вводом образца и значением максимальной интенсивности пика. Два вещества можно разделить в том случае, если у них разные времена удерживания. t'_R — *фактическое время удерживания*, или *приведенное время удерживания*. На рис. 2.9 показано, что $t_R = t_0 + t'_R$. Значение t_0 одинаково для всех элюируемых веществ. Оно говорит лишь о времени пребывания подвижной фазы в колонке. t'_R — это время удерживания вещества

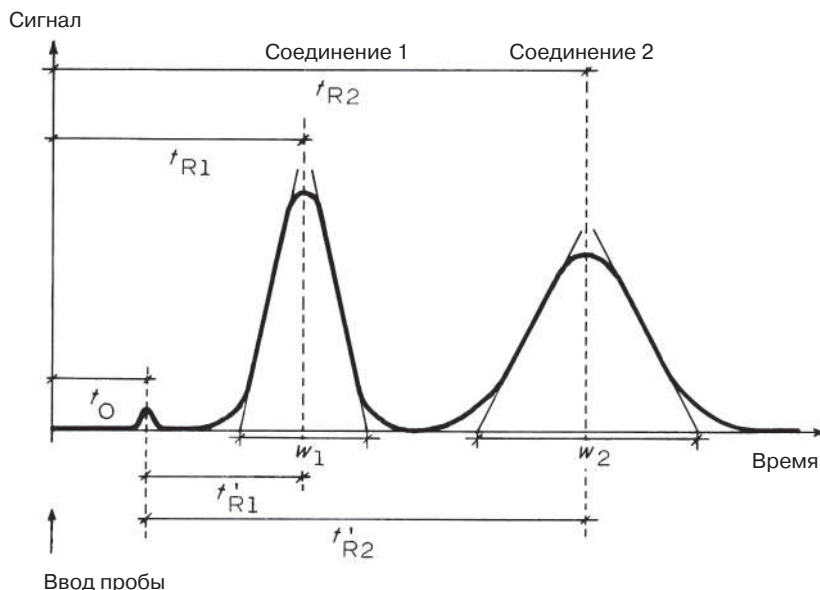


Рис. 2.9. Вид хроматограммы и ее характеристики

¹ $w = 4\sigma$, где σ — стандартное отклонение Гауссова пика.

² Удерживаемый объем $V_R = Ft_R$ (F — объемная скорость потока, мл/мин). Мертвый объем $V_0 = Ft_0$.

неподвижной фазой, у каждого анализируемого соединения эта величина своя. Чем дольше вещество задерживается на неподвижной фазе, тем позже оно элюируется.

Время удерживания зависит от скорости потока и длины колонки. Если скорость подвижной фазы низкая или колонка слишком длинная, то t_0 , а следовательно, и t_R будет большим. Для описания характеристик вещества параметр t_R не годится.

Поэтому предпочитают использовать коэффициент удерживания, или значение k (ранее известный как коэффициент емкости k'):

$$k = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0},$$

k — величина, не зависящая от длины колонки и скорости подвижной фазы, характеризующая, как было описано в разделе 2.1, молярное соотношение вещества на неподвижной фазе и в элюенте.

Задача 1

Вычислить значения k соединений 1 и 2 на рис. 2.9.

Решение

$t_0 = 12,5$ мм, $t_{R1} = 33,1$ мм, $t_{R2} = 70,5$ мм.

$$k_1 = \frac{t_{R1} - t_0}{t_0} = \frac{33,1 - 12,5}{12,5} = 1,6,$$

$$k_2 = \frac{t_{R2} - t_0}{t_0} = \frac{70,5 - 12,5}{12,5} = 4,6.$$

Оптимальные значения коэффициента удерживания находятся в интервале 1–10. Если k слишком мал, то разделение неэффективно (если вещества слишком быстро покидают колонку, значит, они не удерживаются на сорбенте и никакого разделения не происходит). Большие значения k говорят о длительности разделения.

Коэффициент удерживания связан с коэффициентом распределения, о котором говорилось в разделе 2.1, следующим образом¹:

$$k = K \frac{V_s}{V_m},$$

где V_s — объем неподвижной фазы, V_m — объем подвижной фазы в колонке.

Коэффициент удерживания прямо пропорционален объему сорбента, а точнее его удельной площади ($\text{м}^2/\text{г}$) в случае адсорбентов. В отличие от колонок, упакованных пористыми частицами, на колонках с поверхностно-пористыми частицами возможны малые значения k , а следовательно, и более быстрый анализ вещества при условии, что остальные условия эксперимента неизменны. Коэффициент удерживания k на мелкопористом силикагеле больше по сравнению с крупнопористым сорбентом.

¹ Данная формула работает только в так называемой линейной области, когда k не зависит от количества образца. В случае массовой перегрузки эта формула не подходит.

Если у двух веществ одинаковые значения k , то их нельзя разделить. Это подтверждает коэффициент селективности α (или коэффициент относительного удерживания):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{K_2}{K_1},$$

при условии $k_2 > k_1$. Если $\alpha = 1$, то вещества не разделяются, так как у них одни и те же времена удерживания. Коэффициент селективности — это оценка способности хроматографической системы разделить два соединения, т.е. оценка ее селективности. На значения α влияет выбор сорбента и элюента.

Задача 2

Определить значение α для соединений 1 и 2.

Решение

В первой задаче были вычислены значения $k_1 = 1,6$ и $k_2 = 4,6$, следовательно, $\alpha = 4,6/1,6 = 2,9$.

Разрешение R двух соседних пиков определяют как отношение расстояний между максимумами этих пиков, т.е. разницы между двумя временами удерживания t_R и средним значением ширины при основании этих пиков w^1 :

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{1/2_1} + w_{1/2_2}},$$

где $w_{1/2}$ — ширина пика на полувысоте.

Если $R = 1$, то пики не полностью разделены. При этом на хроматограмме можно видеть два пика. В большинстве случаев затруднительно провести количественный анализ при $R = 1$. Требуется разделение пиков до базовой линии, т.е. $R = 1,5$. Если один из пиков явно меньше соседнего пика, то необходимо, чтобы R было еще больше. Более подробно этот материал описан в разделе 19.5.

Задача 3

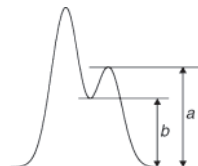
Определить разрешение пиков 1 и 2.

Решение

$t_{R1} = 33,1$ мм, $t_{R2} = 70,5$ мм; $w_1 = 17$ мм, $w_2 = 29$ мм.

$$R = \frac{2(70,5 - 33,1)}{17 + 29} = 1,6.$$

¹ Эти уравнения редко используют для расчетов пар пиков, площади которых сильно отличаются, и для несимметричных пиков. В таких случаях вводят индекс разделения пиков (PSI) $PSI = 1 - \frac{b}{a}$.



Определение ширины пика на уровне базовой линии вручную

Касательные к точке перегиба¹ проводят к каждой стороне Гауссова пика, что обычно не вызывает проблем. Тем не менее ширину линии самописца необходимо учитывать. Это лучше всего сделать, добавив к ширине сигнала ширину линии только с одной стороны, а не с обеих (рис. 2.10). Ширина основания пика — это расстояние вдоль базовой линии между двумя точками пересечения касательных с базовой линией.

Наконец, с помощью хроматограммы можно определить число теоретических тарелок N :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2,$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2,$$

где $w_{1/2}$ — ширина пика на половине высоты;

$$N = 2\pi \left(\frac{h_p t_R}{A} \right)^2,$$

h_p — высота пика, A — площадь пика.

По всем трем уравнениям можно вычислить точные значения N , если пики на хроматограмме Гауссовой формы. Только вряд ли в реальной жизни существуют такие пики на хроматограмме². Точные значения асимметричных пиков можно получить с помощью метода моментов³. Приблизительно точные значения N можно определить по уравнению⁴:

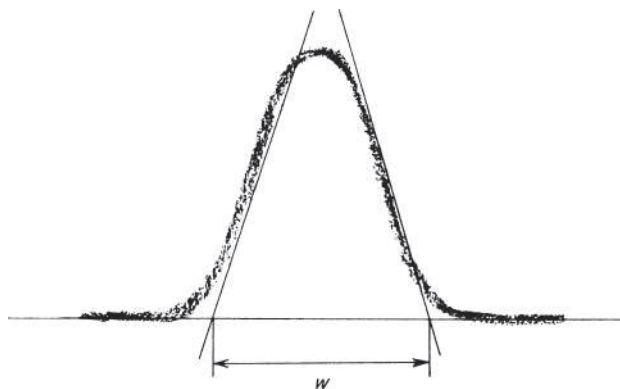


Рис. 2.10. Проведение касательной к сторонам пика

¹ Точка перегиба — это точка, в которой наклон меняет свой знак, \int — положительный наклон, \int — отрицательный наклон.

² B. A. Bidlingmeyer and F. V. Warren, *Anal. Chem.*, **56**, 1583A (1984).

³ Определение: $m_n = \int_0^x t^n f(t) dt$. Второй момент с $n = 2$ соответствует дисперсии пика σ .

При $w = 4\sigma$ можно подсчитать N . Источник: N. Dyson, *Chromatographic integration Methods*, Royal Society of Chemistry, London, 2nd ed., 1998, p. 23.

⁴ J. P. Foley and J. G. Dorsey, *Anal. Chem.*, **55**, 730 (1983).

$$N = 41,7 \frac{(t_R / w_{0,1})^2}{T + 1,25},$$

где $w_{0,1}$ — ширина пика на высоте 10 % от основания пика, T — соотношение расстояний $b_{0,1}/a_{0,1}$ (рис. 2.25).

Эффективность упаковки колонки оценивают по количеству теоретических тарелок для неудерживаемого пика. При этом на число теоретических тарелок для поздно элюируемых пиков влияют процессы массопереноса. Как правило, величина N больше для удерживаемых соединений, поскольку вклад в размывание полосы вещества, вызванное внеколоночным объемом хроматографической системы (см. раздел 2.6), меньше по сравнению с ранее элюируемыми пиками.

Задача 4

Рассчитать количество теоретических тарелок для последнего пика на рис. 2.9.

Решение

$t_{R2} = 70,5$ мм, $w_2 = 29$ мм.

$$N = 16 \left(\frac{70,5}{29} \right)^2 = 94.$$

Высоту теоретической тарелки H легко определить, зная длину колонки:

$$H = \frac{L}{N},$$

где H — это расстояние, на котором достигается хроматографическое равновесие (рис. 2.1), и называется *высота, эквивалентная теоретической тарелке* (ВЭТТ).

Задача 5

Красный жирный 7В, 1-[(п-бутилфенил)азо]-2-нафтол, 1-[(п-метоксифенил)азо]-2-нафтол, 1-[(м-метоксифенил)азо]-2-нафтол, 1-[(о-метоксифенил)азо]-2-нафтол красные тестовые красители разделяли на колонке низкого давления фирмы Мерск. Сорбент — силикагель 60, размер частиц 40–63 мкм, элюент — 50 % насыщенный водой хлористый метилен, скорость потока — 1 мл/мин.

По хроматограмме (рис. 2.11) определить:

- коэффициенты удерживания пиков 1–5;
- коэффициенты селективности лучших и худших пар разделившихся пиков;
- разрешение этих двух пар пиков;
- число теоретических тарелок пиков 1–5.

Решение

- $k_1 = 0,51$; $k_2 = 1,15$; $k_3 = 1,51$; $k_4 = 1,88$; $k_5 = 2,50$.
- $\alpha_{12} = 2,2$; $\alpha_{34} = 1,2$.
- $R_{12} = 2,4$; $R_{34} = 0,79$.
- $N_1 = 720$; $N_2 = 850$; $N_3 = 760$; $N_4 = 770$; $N_5 = 850$.

(В зависимости от точности подсчетов и используемых формул ваши результаты могут различаться.)

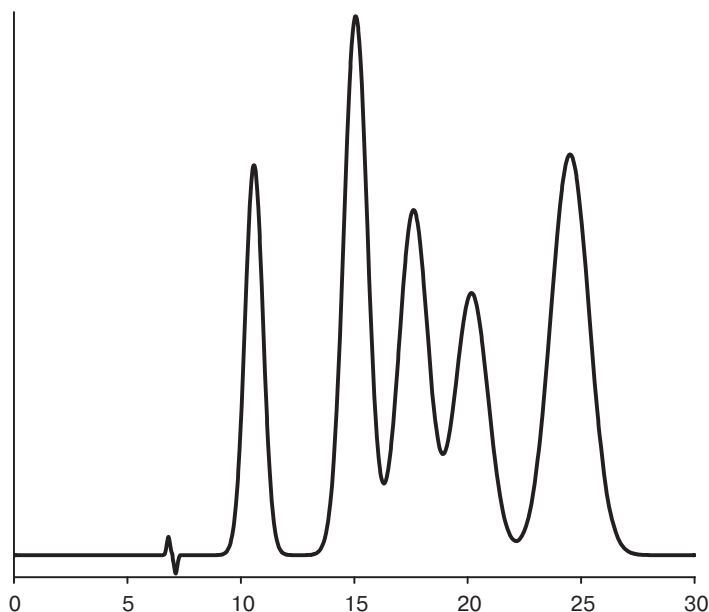


Рис. 2.11. Хроматограмма красных тестовых красителей

2.4. Графическое изображение пар пиков с разной степенью разрешения¹

Приобретя некоторый опыт в хроматографии, несложно понять, в чем заключается смысл разрешения R . В этом помогут хроматограммы, изображенные на рис. 2.13–2.18. Там показаны пары пиков с разными разрешениями и разными соотношениями размеров 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1, 32:1, 64:1, 128:1. Эти значения можно ввести в компьютер и в любое время сравнивать их с данными реальных хроматограмм. На практике реальные пики отличаются от идеальных: они несимметричны (т. е. имеют размывание заднего фронта пика, см. раздел 2.7), кроме того, соседние пики редко бывают одинаковой ширины.

Данные рисунков позволяют с достаточной точностью оценить разрешение пар пиков. Нет необходимости рассчитывать R для полуколичественных целей по одной из выше приведенных формул.

Задача 6

Определить разрешения пар пиков, отмеченных на рис. 2.12 стрелками.

Решение

Пара пиков	1	2	3	4	5	6
Соотношение	1:1	2:1	1:1	1:2	1:2	1:8
Разрешение	0,8	0,6	>1,25	1,25	0,7	0,8

¹ L. R. Snyder, J. Chromatogr. Sci., **10**, 200 (1972).

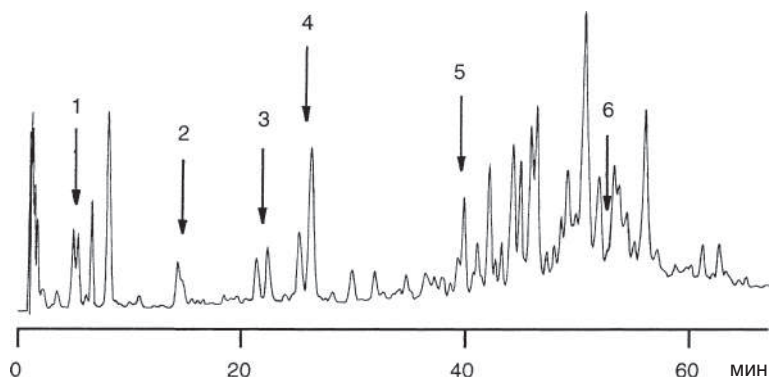


Рис. 2.12. Разделение пептидов, выделенных из лактальбумина, обработанного пепсином. Градиентное разделение в системе вода/ацетонитрил с добавлением 0,1 % трифторуксусной кислоты на С4-фазе, длина волны 210 нм

На рис. 2.13–2.17 имеются точки и стрелки. Точки отображают истинную высоту пика и истинное время удерживания. Если разрешение низкое, то невозможно интуитивно поставить точку, определяющую вершину пика, в правильное положение, которое обычно находится ниже суммарной кривой. Стрелки указывают момент, когда в препаративной хроматографии оба пика разделяются на фракции одинаковой чистоты. Число над каждой стрелкой означает полученный процент чистоты. Однако эти цифры верны только в том случае, если соотношение между количеством образца и сигналом (т.е. высотой пика и его площадью) одинаково для обоих веществ. Такое приблизительно одинаковое соотношение может быть у гомологов. Для всех остальных веществ данное пред-

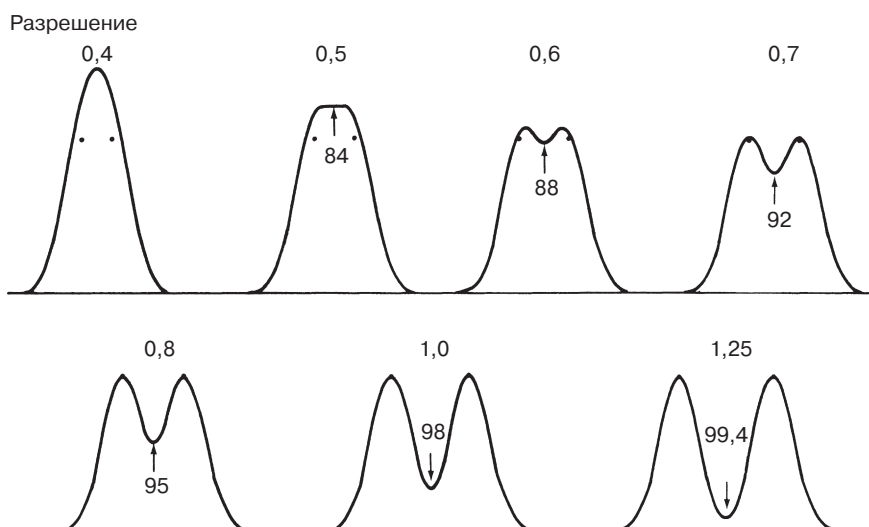


Рис. 2.13. Разрешение соседних пиков, соотношение 1:1. Публикуется с разрешения из работы L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 200 (1972)

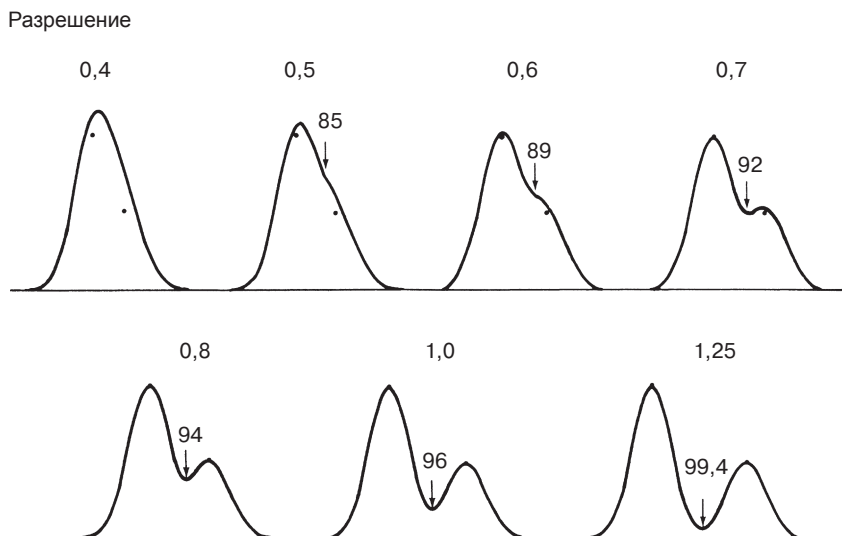


Рис. 2.14. Разрешение соседних пиков, соотношение 2:1. Публикуется с разрешения из работы L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 200 (1972)

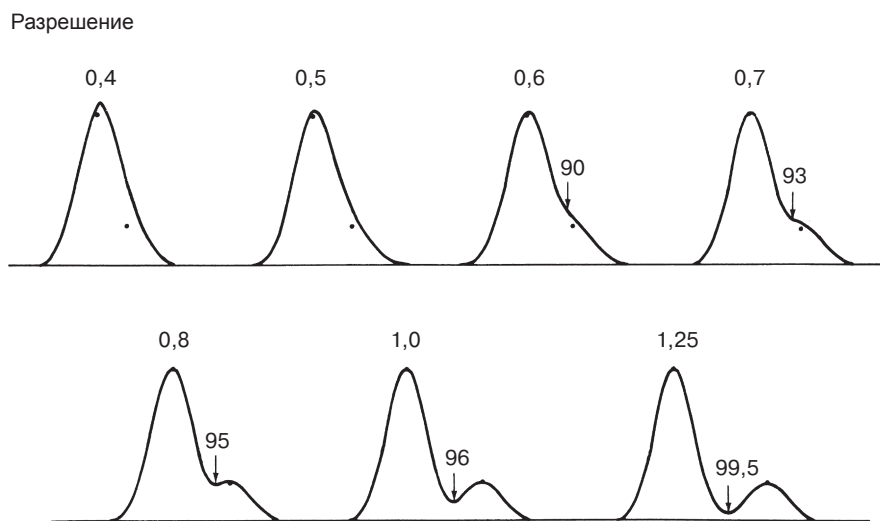


Рис. 2.15. Разрешение соседних пиков, соотношение 4:1. Публикуется с разрешения из работы L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 200 (1972)

положение в корне неверно, поскольку даже небольшие отклонения в структуре молекулы существенно влияют на отклик детектора.

Подобные графические изображения с разным соотношением площадей пиков и разрешением можно легко получить с помощью вычислений в электронной таблице (например, Lotus, Excel и т.д.)¹. Следующее уравнение описывает Гауссову форму пика:

¹ V. R. Meyer, *LC GC Int.*, **7**, 590 (1994).

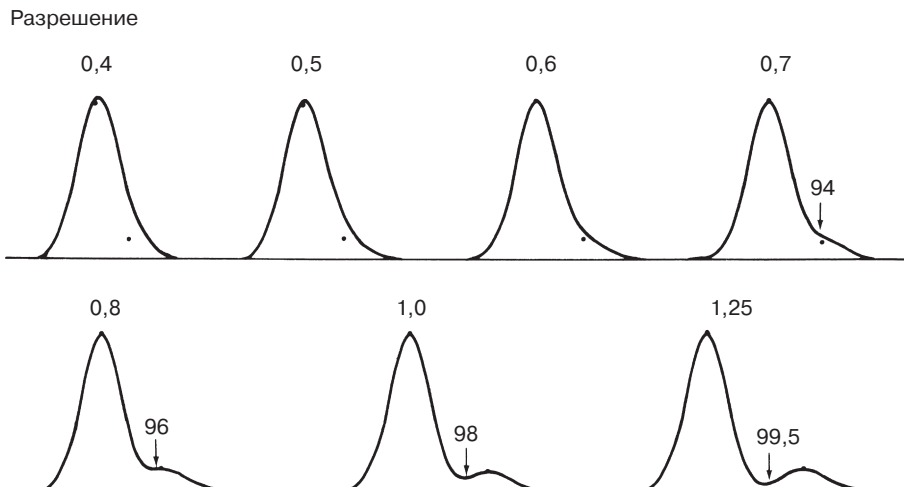


Рис. 2.16. Разрешение соседних пиков, соотношение 8:1. Публикуется с разрешения из работы L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 200 (1972)

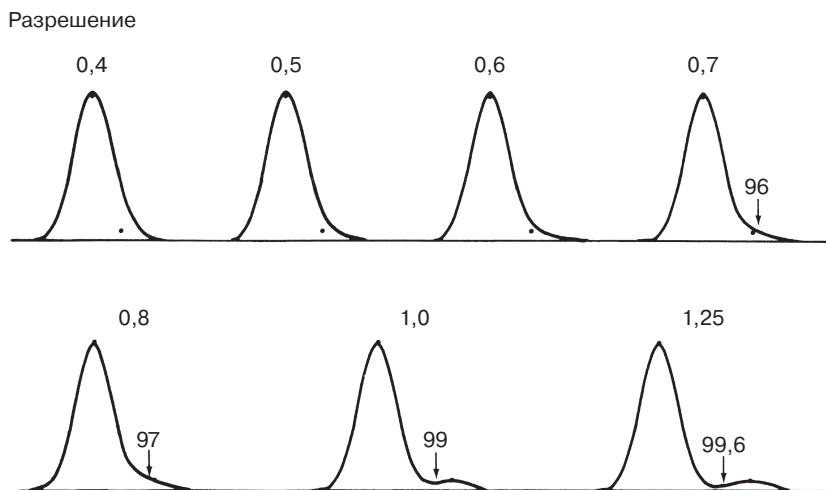


Рис. 2.17. Разрешение соседних пиков, соотношение 16:1. Публикуется с разрешения из работы L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 200 (1972)

$$f(t) = \frac{A_p}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-(t-t_R)^2/2\sigma^2},$$

где t — время по оси абсцисс, t_R — время удерживания (время, соответствующее максимуму пика), $f(t)$ — сигнал (высота пика), зависящий от времени, A_p — площадь пика, σ — стандартное отклонение Гауссовой функции, которое можно принять за 1. Помимо площадей пиков, на рисунках также указаны соотношения пиков. Например, на рис. 2.14 соотношение площадей пиков составляет 2:1. Необходимое разрешение получено, исходя из известного уравнения $R = 2\Delta t_R/(w_1 + w_2)$ при $w = 4\sigma$. Если $\sigma = 1$, то $w_1 + w_2 = 8$. Независимо от того,

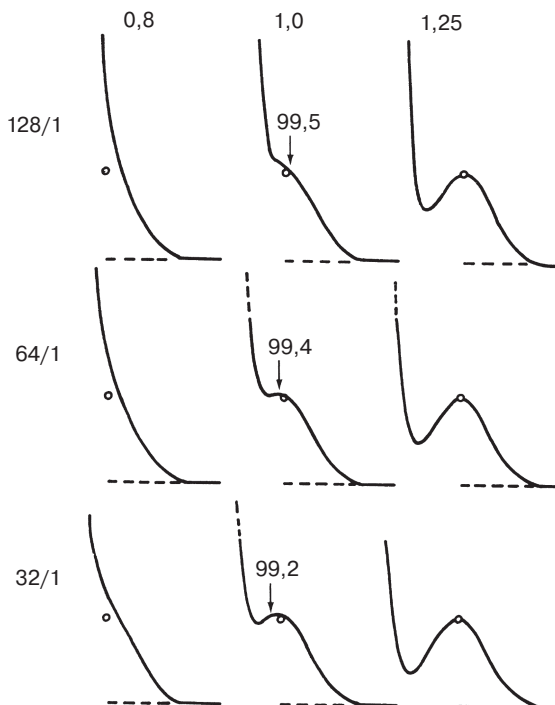


Рис. 2.18. Разрешение соседних пиков, соотношения 32:1, 64:1, 128:1. Публикуется с разрешения из работы L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 200 (1972)

каким будет t_R первого пика, время удерживания второго пика будет составлять $t_R + \Delta t_R$. Математическое уравнение для несимметричных пиков достаточно сложное.

2.5. Факторы, влияющие на разрешение

Разрешение R двух пиков зависит от коэффициента селективности α , числа теоретических тарелок N и коэффициента удерживания k :

$$R = \frac{1}{4}(\alpha - 1)\sqrt{N} \left(\frac{k_1}{1 + k} \right) = \frac{1}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \sqrt{N} \frac{k_2}{1 + k},$$

$$\bar{k} = \frac{k_1 + k_2}{2},$$

где $N_1 = N_2$, т.е. это изократическое разделение¹.

Коэффициент α — это мера хроматографической селективности. Он принимает большие значения, когда исследуемые вещества с разной степенью

¹ J. P. Foley, *Analyst*, **116**, 1275 (1991). Если $N_1 \neq N_2$, то $R = 1/4[(\alpha - 1)/\alpha](N_1 N_2)^{0.25} \bar{k} / (1 + \bar{k})$. Если $k_1 \approx k_2$, то $R = 1/4(\alpha - 1)\sqrt{N}k/(1 + k)$.

интенсивности взаимодействуют с подвижной и/или неподвижной фазой. Тип сил, вызывающих взаимодействия (например, дисперсионных, диполь-дипольных взаимодействий, водородных связей, π - π взаимодействий, ионных в ионообменной хроматографии), существенно влияет на селективность.

N характеризует эффективность колонки. Число теоретических тарелок возрастает с улучшением упаковки колонки, с увеличением ее длины и при работе на оптимальных скоростях потока подвижной фазы. На колонке с большим N можно разделить компоненты, коэффициенты селективности которых сходны. Если α имеет небольшие значения, то добиться требуемой степени разрешения можно за счет увеличения числа тарелок (табл. 2.1).

На рис. 2.19 показано влияние коэффициента селективности и числа тарелок на разделение двух соседних пиков. Если вещества на колонке хорошо расходятся относительно друг друга, то даже с небольшим числом теоретических тарелок можно получить приемлемое разрешение (а). Колонка обладает малой эффективностью, но при этом хорошей селективностью. Высокий коэффициент селективности и большое число теоретических тарелок дают разрешение, значение которого выше оптимального, что приводит к неоправданно долгому анализу (б). Разрешение существенно снижается, если N такое же, как в случае (а), т. е. низкое, и также малый коэффициент селективности (в). Колонка с большим числом теоретических тарелок гарантирует приемлемое разрешение, когда α мало (г).

Таблица 2.1. Влияние числа теоретических тарелок на разрешение при разных коэффициентах селективности, $k_1 = 10$

Коэффициент селективности α	Теоретические тарелки	
	$R = 1,0$	$R = 1,5$
1,005	780000	1750000
1,01	195000	440000
1,05	8100	18000
1,10	2100	4800
1,25	320	860
1,50	120	260
2,0	40	90

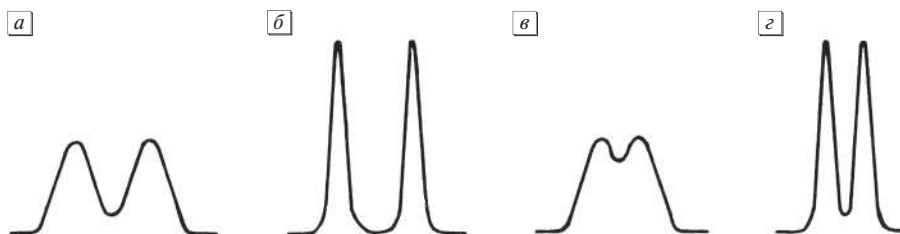


Рис. 2.19. Относительное удерживание, число тарелок и разрешение



Коэффициент удерживания k зависит только от «силы» элюента (при постоянном объемном соотношении подвижной и неподвижной фаз). Чем «сильнее» подвижная фаза, тем быстрее происходит элюция веществ.

Как улучшить разрешение

Существует несколько способов улучшения разрешения пиков на хроматограмме.

- а) В разделе 2.3 уже упоминалось, что коэффициент k должен находиться в интервале от 1 до 10 (и быть не менее 5, если разделение сложное). Если при расчетах получены иные значения k , то состав подвижной фазы необходимо подбирать то тех пор, пока k не примет оптимального значения (см. обсуждения отдельных методов разделения).
- б) Если качество разделения неудовлетворительно, то следует увеличить число теоретических тарелок. Реализовать эту цель можно следующими способами: 1) купить или набить более эффективную колонку; 2) использовать колонку длиннее прежней или установить две колонки последовательно (при этом обе колонки должны быть в хорошем состоянии, если одна из двух колонок «плохая», то разделение останется неудовлетворительным); 3) оптимизировать скорость потока. На рис. 2.7 показано, что высота, а следовательно, и число теоретических тарелок зависят от скорости потока. Поэтому, чтобы найти оптимальное значение, придется исследовать большой диапазон объемных скоростей потока. Если коэффициенты диффузии молекул образца в подвижной фазе известны, то возможно примерно определить приведенную скорость потока (см. разделы 8.5 и 8.6), если разделение проходит вблизи оптимума на кривой Ван-Деемтера. Разрешение пропорционально квадратному корню из числа теоретических тарелок. Увеличив в 2 раза N , можно улучшить разрешение всего в 1,4 раза. При этом время анализа также увеличивается. Если стало очевидно, что колонка плохо разделяет, то причиной этого может быть малое число теоретических тарелок — вместо ожидаемых 6000 тарелок у нее всего лишь 3000. В этом случае необходимо старую колонку заменить на новую.
- в) Самый эффективный, но зачастую самый сложный способ улучшить разрешение — это увеличение коэффициента селективности α . При необходимости стоит задуматься о замене неподвижной фазы (силикагель на окись алюминия или обращенно-фазовую хроматографию использовать вместо нормально-фазовой). И все же в первую очередь следует изменить элюент. Новый элюент должен обладать такой же элюирующей силой, как и прежний (так как k уже оптимизирован), но иначе взаимодействовать с веществом и сорбентом. Например, диэтиловый эфир и хлористый метилен обладают одинаковой элюирующей силой в адсорбционной хроматографии, однако отличаются протонно-акцепторными и дипольными характеристиками.

На рис. 2.20 показано, как влияют изменения k , α , N на разделение, при том что все остальные параметры процесса не менялись. Разрешение в исходном разделении составляет 0,8.

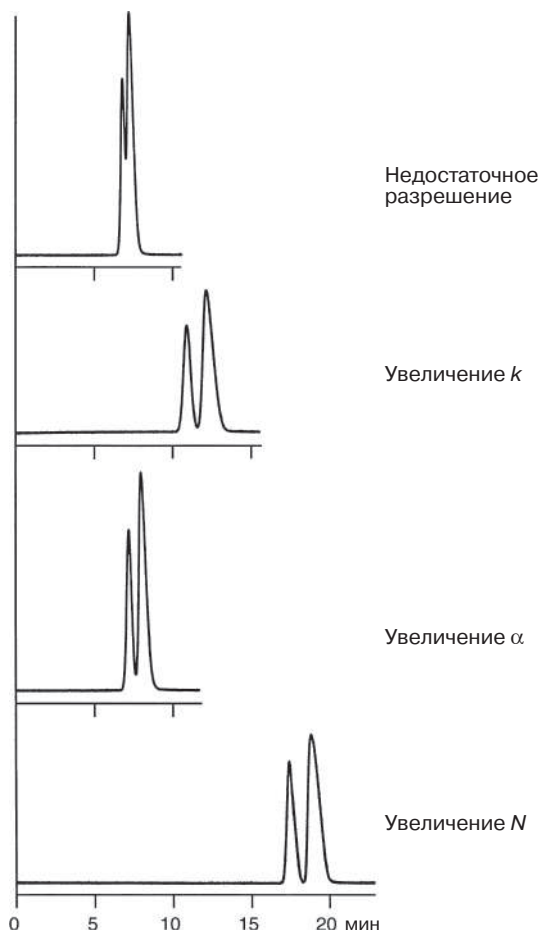


Рис. 2.20. Три способа улучшить разрешение. Задача: разделить ацетофенон (первый пик) и вератрол. Исходные условия: колонка 5 см × 2 мм, сорбент YMC-Pack ODS-AQ, 3 мкм, подвижная фаза вода-ацетонитрил (80:20), скорость потока 0,3 мл/мин, УФ, 254 нм. k увеличили за счет снижения доли органического растворителя в элюенте (вода-ацетонитрил (85:15)), все остальные условия хроматографирования оставались неизменными. Переход на элюент вода-метанол (70:30) позволил увеличить параметр α . Число теоретических тарелок N возросло после замены колонки на 15-сантиметровую

Задача 7

В экспериментах использовали препаративную колонку с 900 теоретическими тарелками и аналитическую с 6400 теоретическими тарелками. Предварительные эксперименты показали, что на обеих колонках коэффициенты удерживания двух веществ в смеси одинаковы. Для препаративного разделения требуется разрешение 1,25. Определить, каким должно быть оптимальное раз-

решение на аналитической колонке, чтобы можно было успешно осуществить препаративное разделение.

Решение

Уравнение для разрешения можно переписать следующим образом:

$$\frac{4R}{\sqrt{N}} = (\alpha - 1) \frac{k_1}{1 + k}$$

На обеих колонках значения k одинаковы, значит, одинаковы и α . Следовательно,

$$\frac{4R_{\text{ан}}}{\sqrt{N_{\text{ан}}}} = \frac{4R_{\text{пр}}}{\sqrt{N_{\text{пр}}}},$$

$$R_{\text{ан}} = \frac{R_{\text{пр}} \sqrt{N_{\text{ан}}}}{\sqrt{N_{\text{пр}}}} = \frac{1,25 \sqrt{6400}}{\sqrt{900}} = \frac{1,25 \cdot 80}{30} = 3,3.$$

Решению этой задачи соответствует промежуточное состояние между (б) и (а) на рис. 2.19

Задача 8

В литературе описано ВЭЖХ-разделение, в котором $k_A = 0,75$, $k_B = 1,54$, $k_C = 2,38$, $k_D = 3,84$. Можно ли разделить эти вещества на колонне низкого давления с числом теоретических тарелок 300, на том же самом сорбенте и с минимальным разрешением, равным 1?

Решение

$$\alpha_{AB} = \frac{1,54}{0,75} = 2,05; \quad \alpha_{BC} = \frac{2,38}{1,54} = 1,55; \quad \alpha_{CD} = \frac{3,84}{2,38} = 1,61.$$

Хуже всех делится пара пиков BC , значит, критический коэффициент селективности 1.55.

Дано: $\alpha = 1,55$, $k_1 = k_B = 1,54$, $\bar{k} = (1,54 + 2,38)/2 = 1,96$, $R = 1$, $N_{\text{мин}} = ?$

$$\sqrt{N_{\text{мин}}} = \frac{4R}{\alpha - 1} \left(\frac{1 + \bar{k}}{k_1} \right)$$

$$\sqrt{N_{\text{мин}}} = \frac{4}{1,55 - 1} \left(\frac{1 + 1,96}{1,54} \right) = 14,$$

$$N_{\text{мин}} = 196.$$

Следовательно, вещества можно разделить.

Хроматограмма сложной смеси может быть представлена в «сокращенной» форме: достаточно показать плохо разделившуюся пару пиков¹ (при этом все остальные пары пиков на хроматограмме могут находиться близко друг к другу, но разделиться хорошо) и последний пик. Таким образом, можно будет определить интервал k , который необходим для улучшения разрешения. На рис. 2.21 показан пример сокращенной хроматограммы.

¹ G. K. Webster *et al.*, *J. Chromatogr. Sci.*, **43**, 67 (2005).

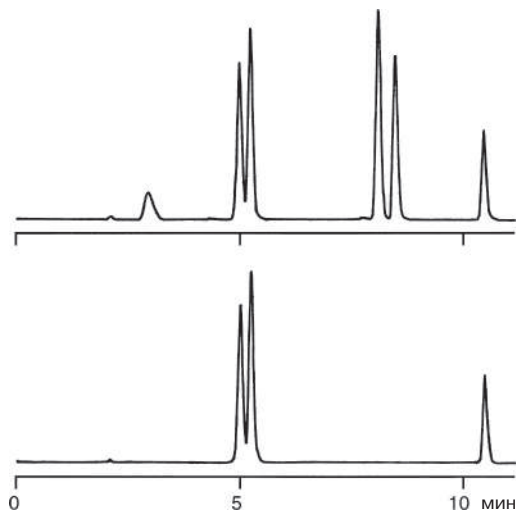


Рис. 2.21. Сокращенная хроматограмма. Верхняя хроматограмма: разделение смеси взрывчатых веществ (пики: t_0 , ацетон, октоген, гексоген, тетрил, тринитротолуол, тетранитропентаэритрит). Нижняя хроматограмма: фрагмент хроматограммы, на котором показаны только сигналы при t_0 , плохо разделившаяся пара пиков октогена и гексогена и последний пик тетранитропентаэритрита. Условия: колонка $250 \times 4,6$ мм, сорбент Grom-Sil 80 ODS-7 PH, размер частиц 4 мкм, элюент 50 % водный ацетонитрил, скорость потока 1 мл/мин, градиент 50 \rightarrow 70 % ацетонитрила за 8 мин, УФ, 220 нм

2.6. Внеколоночные объемы (мертвые объемы)¹

Объемы всех узлов хроматографической системы, через которые проходит образец, оказывают влияние на разделение и называются внеколоночными объемами. (В данном контексте не стоит употреблять выражение мертвые объемы, поскольку иногда объем удерживания при t_0 также называют мертвым объемом.) К внеколоночным объемам относят: объем инжектора, объем капилляров между инжектором и колонкой, колонкой и детектором, объем ячейки детектора, соединительных фиттингов, а также, в зависимости от комплектации хроматографической системы, объемы дополнительных узлов (например, теплообменные капилляры, которые обычно находятся внутри детектора, или переключающие краны). Объемы элюента до инжектора и после детектора к внеколоночным не относятся.

Внеколоночные объемы должны быть минимальными, так как они влияют на разделение. Внеколоночные объемы являются одной из причин уширения и размывания задних фронтов пиков. Их вклады в размывание пика суммируются². Если вклад каждого узла добавляет в размывание пика по 5%,

¹ R. P. W. Scott, *J. Liquid Chromatogr.*, **25**, 2567 (2002).

² Инжектор, капилляры, фиттинги, колонка и детектор (т.е. весь процесс разделения) вносят свой вклад в дисперсию пика σ^2 , следовательно, ширина Гауссова пика $w = 4\sigma$ вычисляется по уравнению: $w = 4\sqrt{\sigma_{\text{инж}}^2 + \sigma_{\text{кап}}^2 + \sigma_{\text{фит}}^2 + \sigma_{\text{кол}}^2 + \sigma_{\text{дет}}^2}$.

то пренебрегать ухудшением хроматографической эффективности в целом уже не представляется возможным. Поскольку изменить конструкцию инжектора и детектора практически невозможно, то использование подходящих капилляров для соединения узлов может снизить внеколоночные объемы.оборот «подходящие капилляры» означает, что внутренний диаметр капилляров должен быть 0,17 или 0,25 мм (раздел 4.4). Фитинги также должны быть установлены правильно (раздел 4.5).

Требования к хроматографической системе (или внеколоночным объемам) увеличиваются с уменьшением объема удерживания интересующего пика, т.е.:

- а) с уменьшением длины колонки;
- б) с уменьшением диаметра колонки;
- в) с уменьшением коэффициента удерживания k ;
- г) с увеличением эффективности колонки;
- д) с уменьшением коэффициента диффузии вещества в подвижной фазе (в обращенно-фазовых separations этот пункт более важен, нежели в нормально-фазовых).

Если для рано элюируемых пиков число теоретических тарелок заметно меньше, чем для поздно элюируемых пиков, то одной из причин этой проблемы могут быть слишком большие внеколоночные объемы.

2.7. Размывание заднего фронта пика

Более тщательное исследование хроматографического пика показало, что Гауссова форма обычно не бывает абсолютно симметричной. В большей или меньшей степени размывается задний фронт пика, образуя хвост. Отсюда и появилось выражение «хвостование»¹. В исключительных случаях может возникнуть противоположное явление, когда размывается передний фронт пика. На рис. 2.22 представлены различные формы пиков.

Небольшие отклонения пика от Гауссовой формы незначительны и фактически в большинстве случаев являются нормой. Тем не менее более явная асимметрия пиков означает, что хроматографическое разделение не оптимизировано. Размывание заднего фронта пика снижает число теоретических тарелок,

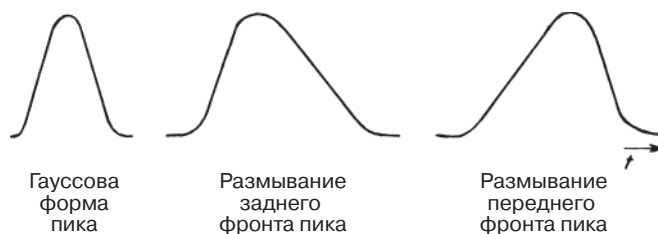


Рис. 2.22. Различные формы пиков

¹ «Хвостование» — это жаргонизм. Правильнее говорить «уширение заднего фронта пика». — *Прим. пер.*

что, в свою очередь, ухудшает разрешение. В таком случае необходимо найти причину и устранить ее. Во время интегрирования у пиков с размытым фронтом сложно определить, где заканчивается один пик и начинается другой. Любой из следующих пунктов может стать причиной размывания пиков.

Плохо упакованная или изношенная колонка

Плохо упакованная или изношенная колонка вызывает образование плеч у пиков или даже раздвоение пиков.

Внеколоночные объемы

Внеколоночные объемы вызывают не только общее размывание пика, но и размытие фронта и требуют более пристального внимания, если:

- у пиков, элюируемых первыми, размывание заднего фронта сильнее, чем у поздно элюируемых пиков;
- при повышении скорости потока эффект усиливается.

Решение проблемы: между инжектором и колонкой, а также колонкой и детектором установить капилляры минимальной длины и минимально возможного диаметра, использовать ячейку детектора меньшего объема.

Перегрузка колонки

Колонка не способна разделять любое количество образца. Если на колонку наносят слишком много вещества, то время удерживания и ширина пика становятся зависимыми от массы образца (рис. 2.23). Пики становятся широкими и асимметричными, в то же время меняется и время удерживания. Размывание заднего фронта сопровождается уменьшением величины удерживания, а размывание переднего фронта пика — увеличением k .

По определению, колонка не достигла уровня перегрузки, если изменение значений k составляет менее 10 % по отношению к бесконечно малому

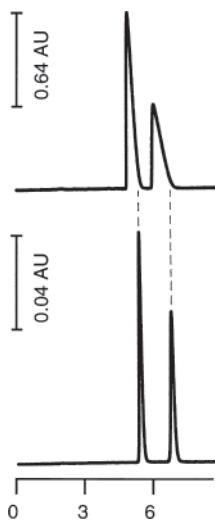


Рис. 2.23. Перегрузка колонки по массе. Верхняя хроматограмма: 2 мг ацетофенона и 2 мг вератрола; нижняя: по 2 мкг каждого вещества. Колонка 250×3,2 мм, сорбент LiChrosorb SI 60 5 мкм, элюент гексан-диэтиловый эфир 9:1, скорость потока 1 мл/мин, УФ, 290 нм, с препаративной или аналитической ячейками соответственно

количеству вещества. В большинстве случаев колонку нельзя считать перегруженной, если на 1 г неподвижной фазы приходится менее 10 мкг вещества. Чтобы определить эффективность колонки, достаточно проанализировать тестовую смесь из расчета 1 мкг вещества на 1 г сорбента и определить число теоретических тарелок. Предполагается, что колонка содержит 1 г сорбента (на самом деле от 0,5 до 5,0 г в зависимости от геометрии колонки).

Химическое размывание заднего фронта пика, несовместимость образца и неподвижной фазы и/или элюента

Размывание заднего фронта пика может возникать даже в тех случаях, когда неизбежные внеколоночные объемы минимизированы, а масса наносимого образца менее 1 мкг/г. В этом случае выбранные подвижная и стационарная фазы непригодны для разделения данного образца. Это явление называют химическим или термодинамическим размыванием заднего фронта пика. Примеры показаны на рис. 9.9 и 10.10.

Химическое размывание заднего фронта пика возникает при:

- а) плохой растворимости образца в элюенте;
- б) смешанном механизме взаимодействия. В ОФ-ЖХ остаточные силанольные группы, не прореагировавшие с алкильными реагентами (раздел 7.5), могут взаимодействовать с основаниями (рис. 2.24). Стационарные фазы нужно синтезировать на основе силикагеля высокой чистоты, а остаточные силанольные группы не должны быть доступны;
- в) разделении ионных образцов в случаях, когда разделение проходит на неподходящих сорбентах;

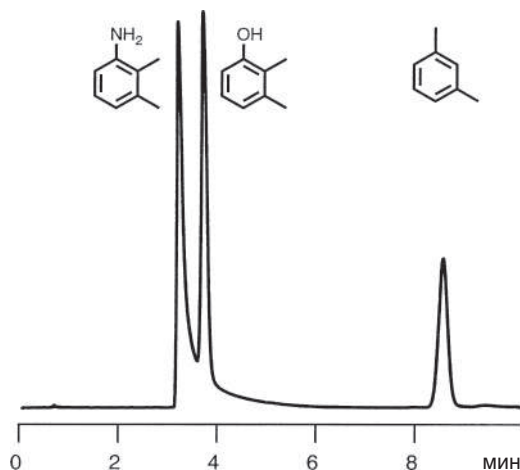


Рис. 2.24. Химическое размывание заднего фронта пика вещества, проявляющего основные свойства. Условия: образец — 2,3-ксилидин, 2,3-диметилфенол и м-ксилидин. Колонка 250×4 мм, сорбент LiChrospher 60 RP-Select B, размер частиц 5 мкм, элюент вода-метанол (35:65), скорость подвижной фазы 1,5 мл/мин, УФ, 260 нм

- г) использовании в адсорбционной хроматографии слишком активной стационарной фазы (раздел 9.4).

Решение проблемы: поменять подвижную и/или неподвижную фазу¹, изменить рН или перейти к другой методике (например, ион-парной хроматографии). Возможно, в адсорбционной хроматографии также потребуются изменить рН, добавить уксусную или муравьиную кислоту, если вещество проявляет кислотные свойства, или пиридин, триэтиламин, аммиак в случае, когда анализируемое соединение является основанием.

Слишком большая постоянная времени детектора

Из-за слишком большого значения постоянной времени детектора (раздел 6.1) пики становятся размытыми, несимметричными и невысокими.

Решение проблемы: установить соответствующее значение постоянной времени детектора.

Асимметрию пика T можно описать различными способами (рис. 2.25). Первый способ (слева): линия на высоте 10 % от основания пика делит пик на две области $a_{0,1}$ и $b_{0,1}$. Первый параметр описывает расстояние от переднего фронта пика до линии, проведенной к высоте пика, второй — от этой линии до заднего фронта пика:

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}}.$$

Второй способ (справа): по правилам Фармакопеи США (АФ) необходимо провести отрезок на высоте 5 % от основания пика. Область слева обозначим f , а ширину на 5 % высоте — $w_{0,05}$:

$$T = \frac{w_{0,05}}{2f}.$$

В случае, если $T > 1,0$, у пика размыт задний фронт, если $T < 1,0$, то передний фронт, и если $T = 1,0$, то пик симметричный.

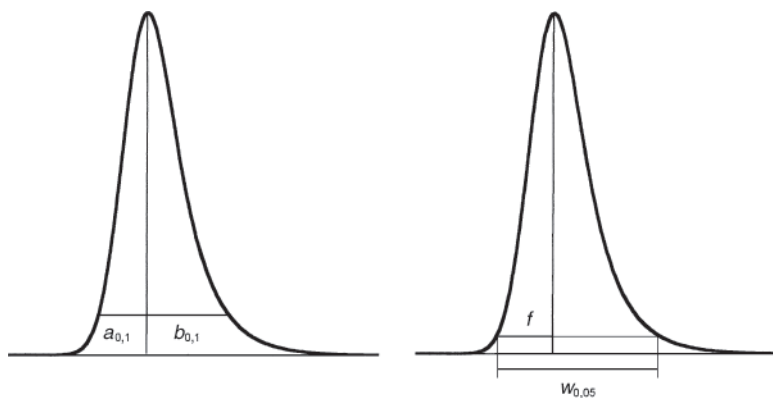


Рис. 2.25. Два способа определения асимметрии пика

¹ J. W. Dolan, *LC GC Int.*, 2 (7), 18 (1989).

Задача 9

Определить асимметрию пика на рис. 2.25 двумя способами.

Решение

$T \approx 1,6$ (слева) и 1,4 (справа, по уравнению Фармакопеи США).

Асимметричные пики можно описать с помощью экспоненциально-модифицированной функции Гаусса (ЭМГ)¹, соответствующей произведению интегральной гауссовой функции и экспоненциальной функции распада с постоянной времени τ .

2.8. Пиковая емкость и статистическая вероятность разрешения²

Об эффективности хроматографической системы можно судить по ее пиковой емкости. Этот параметр говорит о том, какое количество компонентов теоретически можно разделить в определенном диапазоне k с разрешением всех пиков, равным единице. Для определения изократической пиковой емкости, которая пропорциональна квадратному корню из N , необходимо знать количество теоретических тарелок³:

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln(1 + k_{\max})$$

в изократическом режиме, где k_{\max} — это максимальное значение k .

Задача 10

Время проскока колонки, количество теоретических тарелок которой составляет 10000, равно 1 мин. Определить, какое количество пиков можно разделить с разрешением 1 за 5 мин.

Решение

$t_0 = 1$ мин, $t_{R\max} = 5$ мин.

$$k_{\max} = \frac{5-1}{1} = 4,$$

$$n = 1 + \frac{\sqrt{10000}}{4} \ln(1+4) = 1 + (25 \cdot 1,61),$$

$$n = 41.$$

Фактически уравнение для n , приведенное выше, подходит только для изократических разделений и симметричных пиков. В градиентных разделениях

¹ M. S. Jeansonne and J. P. Foley, *J. Chromatogr. Sci.*, **29**, 258 (1991).

² V. R. Meyer and T. Welsch, *LC GC Int.*, **9**, 670 (1996); A. Felinger and M. C. Pietrogrande, *Anal. Chem.*, **73**, 619 A (2001).

³ E. Grushka, *Anal. Chem.*, **42**, 1142 (1970).

значения пиковой емкости больше¹. Размывание заднего фронта пика снижает пиковую емкость колонки. На практике количество теоретических тарелок не бывает постоянным на протяжении всего интервала k . И все-таки сейчас гораздо важнее понять, что речь идет о гипотетическом параметре. Приходится иметь дело с пиками, которые *статистически* распределены в некотором временном интервале. Теория вероятностей позволяет нам перейти от идеальных экспериментов к экспериментам, близким к реальности. К сожалению, эти результаты обескураживают.

Какова вероятность того, что из образца можно выделить определенное вещество в виде отдельного пика, который не будет перекрываться другими пиками?

$$P \approx e^{-2m/n},$$

где P — вероятность, отнесенная к одному пику, m — количество веществ в образце.

Отметим, что на практике параметр m никогда не известен. Всегда надо предполагать наличие неизвестных или нежелательных веществ в образце, которые могут элюироваться в любое время и, возможно, даже вместе с интересующим нас пиком. Тем не менее с помощью приведенного выше уравнения можно решить следующую задачу.

Задача 11

Образец состоит из 10 веществ. Какова вероятность того, что интересующий нас пик будет элюироваться с колонки, имеющей пиковую емкость, равную 41, в виде отдельного пика?

Решение

$$m = 10,$$

$$n = 41,$$

$$P \approx e^{-2 \cdot 10 / 41} = 0,61.$$

Вероятность приемлемого разрешения соседних пиков немного выше 60 % для каждого пика. Можно надеяться, что шесть пиков разделятся, а у остальных четырех будет низкое разрешение либо они не разделятся вообще. В таком случае затруднительно или даже невозможно провести количественный анализ, а фракции с препаративного разделения могут оказаться грязными без каких-либо видимых признаков для оператора. Ситуация может быть еще хуже, если пики разного размера, что на практике встречается очень часто.

Преобразовав уравнение, можно вычислить, какой должна быть пиковая емкость колонки, которая с вероятностью 95 % разрешит пик. Для десятикомпонентной смеси она равна 390, что соответствует числу теоретических тарелок 1 млн (при $k_{\max} = 4$) или коэффициенту удерживания 5,7 млн (при $N = 10\,000$).

¹ U. D. Neue, *J. Chromatogr. A*, **1079**, 153 (2005).

Какова вероятность того, что все компоненты смеси разделятся?

$$P' = \left(1 - \frac{m-1}{n-1}\right)^{m-2},$$

P' — вероятность относительно всех компонентов смеси.

Задача 12

Определить вероятность того, что все вещества десятикомпонентной смеси разделятся на колонке с пиковой емкостью 41.

Решение

$$m = 10,$$

$$n = 41,$$

$$P' = \left(1 - \frac{9}{40}\right)^8 = 0,13.$$

P' составляет всего 13 %, что значительно меньше по сравнению с P , вычисленной в предыдущей задаче, поскольку теперь надо разделить *все* вещества в смеси. Чтобы разделить все пики с 95 % вероятностью, необходима колонка с пиковой емкостью 1400, т. е. 12 млн теоретических тарелок (при $k_{\max} = 4$)!¹

Компьютер генерирует хроматограммы случайным образом (рис. 2.26). Они представляют собой возможные разделения для случаев, когда $m = 10$, $n = 41$, $N = 10000$, с интервалом времени удерживания 4 мин (с 1 по 5 мин). На одной из хроматограмм видны все десять пиков, на остальных — только девять пиков с низким разрешением. На трех хроматограммах невозможно определить, где находится десятый пик, и только на одной хроматограмме его местоположение можно точно определить. Данные хроматограммы очень похожи на те, которые получаются на практике, а реальные хроматограммы зачастую выглядят так же, как и созданные случайным образом.

Все предыдущие рассуждения вовсе не означают, что существующие методы разделения не способны эффективно разделять вещества. Обычно дела обстоят лучше, чем здесь описано, потому что вещества распределены не статистически, а элюируются в соответствии с их физическими свойствами. Например, гомологи элюируются с обращенно-фазового сорбента в порядке увеличения длины углеводородной цепи. Тем не менее в количественном и качественном анализе даже самое эффективное разделение не застраховано от неприятных сюрпризов. Знание описанных здесь уравнений — это помощь в реальном разделении сложных смесей.

Решение проблемы: использование специфического детектирования, дериватизации (раздел 19.8), сочетание ВЭЖХ со спектроскопическими методами (раздел 6.10), оптимизированное градиентное разделение (разделы 18.2 и 18.5) или переключение колонок (многомерное разделение, разделы 18.3 и 18.4).

¹ В данной статье представлено разделение с пиковой емкостью 900: P. Sandra and G. Vanhoenacker, *J. Sep. Sci.*, **30**, 241 (2007).

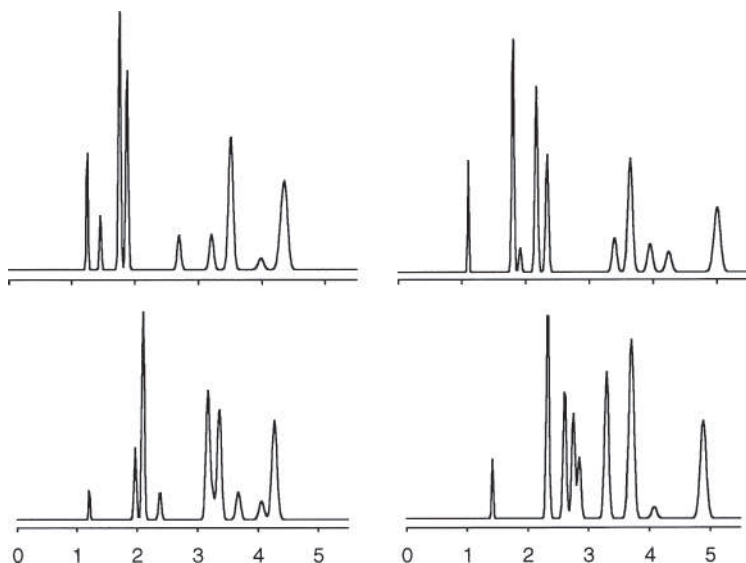


Рис. 2.26. Хроматограммы, сгенерированные компьютером случайным образом. Образец состоит из 10 компонентов, пиковая емкость колонки равна 41

2.9. Влияние температуры на ВЭЖХ-разделение¹

Влияние температуры на ВЭЖХ-разделения невозможно описать какими-то общими законами. С увеличением температуры эффективность колонки, как правило, возрастает. Это связано со снижением вязкости элюента, что, в свою очередь, благотворно сказывается на массопереносе. В то же время эффективность колонки может снизиться. Селективность может увеличиваться или уменьшаться. С увеличением температуры возрастают коэффициенты диффузии, появляется возможность увеличить скорость потока, а значит, сократить время анализа. Это одно из преимуществ увеличения температуры. Если подвижная фаза или раствор образца имеют высокую вязкость, то температуру даже необходимо повышать. Тогда, чтобы перекачать элюент, насосу не потребуется создавать высокое давление и возможно будет ввести образец в инжектор в виде раствора.

Для оптимизации разделения необходимо постоянно следить за влиянием температуры. Часто, при более высокой или низкой температуре разделение может проходить лучше (например, быстрее или точнее). Можно даже работать при высоких температурах (до 200 °C), но при этом хроматографическую систему требуется адаптировать к этим температурам². На рис. 2.27 показан рутинный анализ разделения циклоспоринов при 80 °C. Такой температурный режим особенно важен в разделении высокомолекулярных соединений, включая белки.

¹ C. Zhu, D. M. Goodall and S. A. C. Wren, *LC GC Eur.*, **17**, 530 (2004) или *LC GC North Am.*, **23**, 54 (2005); G. Vanhoenacker and P. Sandra, *J. Sep. Sci.*, **29**, 1822 (2006).

² C. V. McNeff *et al.*, *J. Sep. Sci.*, **30**, 1672 (2007); S. Heinisch and J. L. Rocca, *J. Chromatogr. A*, **1261**, 642 (2009).

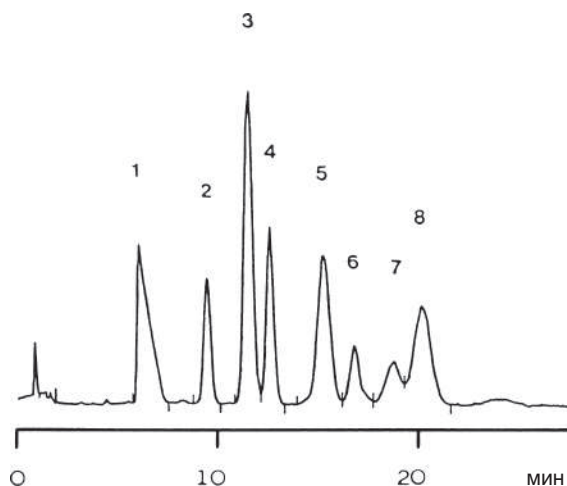


Рис. 2.27. Разделение при высокой температуре. Печатается с разрешения N. M. Djordjevic *et al.*, *J. Chromatogr.*, **550**, 27 (1991). Условия: образец — циклоспорины (CS), колонка 250×4,6 мм, сорбент Ultrasphere ODS 5 мкм, подвижная фаза ацетонитрил: вода: *трет*-бутилметилловый эфир (50:45:5), скорость потока 2 мл/мин, температура 80°C, длина волны 210+230 нм. Пики: 1 — изо-CSA, 2 — CS C, 3 — CS B, 4 — CS L, 5 — CS A, 6 — дигидро-CS A, 7 — CS T, 8 — CS G

Увеличение температуры имеет ряд недостатков:

- а) высока вероятность разложения образца или растворителя;
- б) увеличивается давление паров растворителя, что повышает вероятность образования пузырьков в детекторе. Это, в свою очередь, является причиной нестабильности базовой линии, образования пиков-призраков или даже полного поглощения света;
- в) все равновесия в хроматографии, в особенности все ионные равновесия в водных элюентах (ОФ-ЖХ и ионообменная хроматография), зависят от температуры. Более того, в адсорбционной хроматографии от температуры зависит равновесие между водой в подвижной фазе и адсорбированной водой, и контролировать это равновесие очень сложно при повышенной температуре. В большинстве случаев для хроматографических свойств колонки это равновесие является критическим. Кроме того, от некорректной работы термостата может хромать и воспроизводимость¹;
- г) с увеличением температуры существенно повышается растворимость силикагеля в любых элюентах. Рекомендуется устанавливать термостатируемые предколонки, содержащие силикагель, перед инжектором, а также при работе с привитыми фазами на основе силикагеля.

¹ Пример экстремального влияния температуры на процесс разделения был приведен в статье M. Vecchi, G. Englert, R. Maurer and V. Meduna, *Helv. Chim. Acta*, **64**, 2746 (1981). В статье описано разделение изомеров β-каротина на окиси алюминия. Подвижная фаза, в качестве которой используют гексан, содержит определенную долю воды. В разделии происходят существенные изменения при колебании температуры в 1°C!

Если в комплектацию ВЭЖХ-системы входит термостат колонок, то контролировать температуру анализа не составит труда. Впрочем, эффективный термостат можно сделать самим. Для этого достаточно поместить колонку в стеклянную или металлическую рубашку, присоединенную к термостату. Кроме того, подвижная фаза, до того как она попадет в колонку, также должна быть термостатирована с помощью подходящих подручных средств, например длинной спирали. Также в продаже имеются насосы, у которых поддерживается температурный режим голов, и детекторы с термостатируемой ячейкой.

Для колонок, наполненных силикагелем, температурный максимум составляет 120°C , а для химически привитых силикагельных фаз он не должен превышать 80°C .

Когда подвижная фаза течет по колонке, она также нагревается вследствие трения о неподвижную фазу. Этим фактом не стоит пренебрегать. Эмпирическое правило такое: при перепаде давления в 1 бар температура увеличивается на $0,1^{\circ}\text{C}$, или при перепаде в 100 бар — на 10°C (для воды температура увеличивается на $0,025^{\circ}\text{C}$ при перепаде в 1 бар, или на $2,5^{\circ}\text{C}$ — в 100 бар)¹. Если в работе используется низкокипящий элюент, например пентан, температура кипения которого 36°C , то лучше охлаждать колонку и работать при низких скоростях потока.

2.10. Возможности ВЭЖХ

Martin *et al.* опубликовали статью о теоретических возможностях ВЭЖХ², с которой было бы неплохо ознакомиться. В своей работе они с помощью относительно простых математических уравнений вычисляли оптимальное давление в колонке в зависимости от длины L , размера частиц d_p и скорости подвижной фазы u так, чтобы для решения проблем разделения требовался минимальный перепад давления Δp . Было показано, что оптимизированные колонки работают в области минимума кривой Ван-Деемтера. Эксперименты на хорошо упакованных колонках показали несколько удивительных результатов (приведенная высота тарелки $h = 2\text{--}3$, раздел 8.5).

Проблема «нормального» разделения: требуется 5000 теоретических тарелок, продолжительность анализа 5 минут

Длина колонки, оптимизированной по давлению, составляет 10 см, размер частиц 6,3 мкм. Рекомендованное давление 11,8 бар, при условии, что в адсорбционной хроматографии обычная вязкость подвижной фазы составляет $0,4\text{ мПа}\cdot\text{с}$. (в ОФ-ЖХ вязкость может быть больше в 5 раз, при этом давление также следует увеличивать до 50 бар). Это давление гораздо меньше обычного рабочего давления в большинстве разделений.

¹ Это эмпирическое правило подчиняется уравнению $\Delta T = -\Delta p/C_v$, где p — давление, C_v — теплоемкость воды при постоянном объеме.

² M. Martin, C. Eon and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, **99**, 357 (1974).

Проблема простого разделения: $N = 1000$, $t_R = 1$ минута

Длина колонки, оптимизированной по давлению, составляет 2,2 см, $d_p = 6,9$ мкм, $\Delta p = 2,3$ бара! Для решения простых задач с коэффициентом селективности примерно 1,2 лучше всего использовать короткие колонки. Для этих целей подходят коммерчески доступные колонки длиной 3–5 см, при этом экономятся элюент и время, а объем петли инжектора, внеколоночные объемы и постоянная времени детектора должны быть уменьшены, иначе разделение не будет эффективным.

На рис. 2.28 приведен пример разделения восьмикомпонентной смеси на колонке длиной 5 см.

Проблема сложного разделения: $N = 10^5$, $t_R = 30$ минут

Длина колонки, оптимизированной по давлению, равна 119 см, $d_p = 3,8$ мкм, $\Delta p = 780$ бар. Как показало разделение полициклических ароматических соединений, такие условия могут быть выполнены, если колонка имеет 68 000 теоретических тарелок¹.

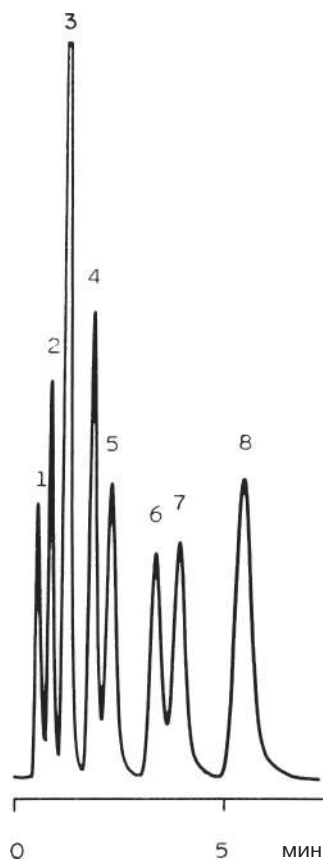


Рис. 2.28. Разделение производных фенотиазина на короткой колонке (Prolabo). Условия: колонка 50×4 мм, сорбент силикагель, 6,2 мкм, элюент диизопропиловый спирт — метанол (1:1), содержащий 2,6% воды и 0,2% триэтиламина, скорость потока 0,8 мл/мин, давление 15 бар, длина волны 254 нм, число теоретических тарелок 850 (последний пик). 1 — 3-хлорофенотиазин, 2 — хлорофенетазин, 3 — хлоропромазин, 4 — промазин, 5 — 5,5-диоксихлорпромазин, 6 — оксихлорпромазин, 7 — 2-хлоро-10-(3-метиламинопропил)-фенотиазин, 8 — N-оксихлорпромазин

¹ M. Verzele and C. Dewaele, *J. High Resolut. Chromatogr. Commun.*, **5**, 245 (1982).

Можно расширить подход принципа оптимизации давления. На рис. 2.29 и 2.30 показаны номограммы хорошо упакованной колонки, которая работает в области минимума кривой Ван-Деемтера¹. На номограмме изображена взаимозависимость длины колонки, давления, числа теоретических тарелок, размера частиц сорбента и времени проскока. Два из этих пяти параметров могут быть выбраны произвольно, остальные три зависят от оптимальной скорости потока.

Номограмма на рис. 2.29 дана для подвижной фазы с низкой вязкостью, типичной для адсорбционной хроматографии (вязкость $\eta = 0,44$ мПа·с, например хлористый метилен). Номограмма на рис. 2.30 — для подвижной фазы с высокой вязкостью, которая, как правило, представляет собой водный раствор и используются в обращенно-фазовой и ионообменной хроматографии (вязкость $\eta = 1,2$ мПа·с, например метанол — вода = 8–2).

Эти номограммы подходят для колонок с конкретной кривой Ван-Деемтера и образцов с известными коэффициентами диффузии. Тем не менее они всегда помогут ответить на вопрос, пригодна или нет данная система для решения

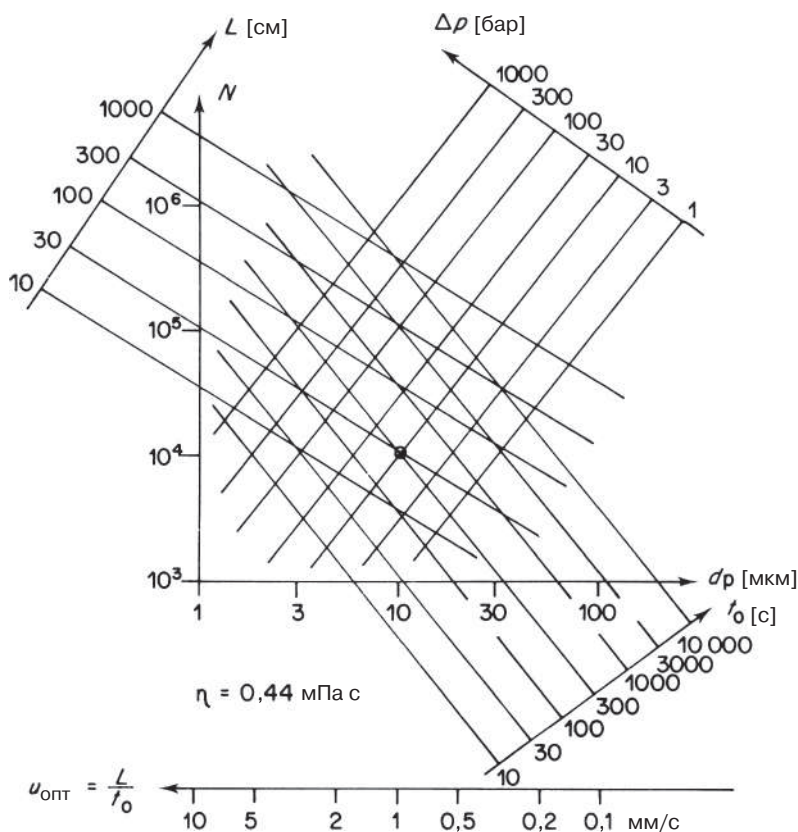


Рис. 2.29. Оптимальные параметры для подвижных фаз низкой вязкости

¹ I. Halász and G. Görlitz, *Angew. Chem.*, **94**, 50 (1982).

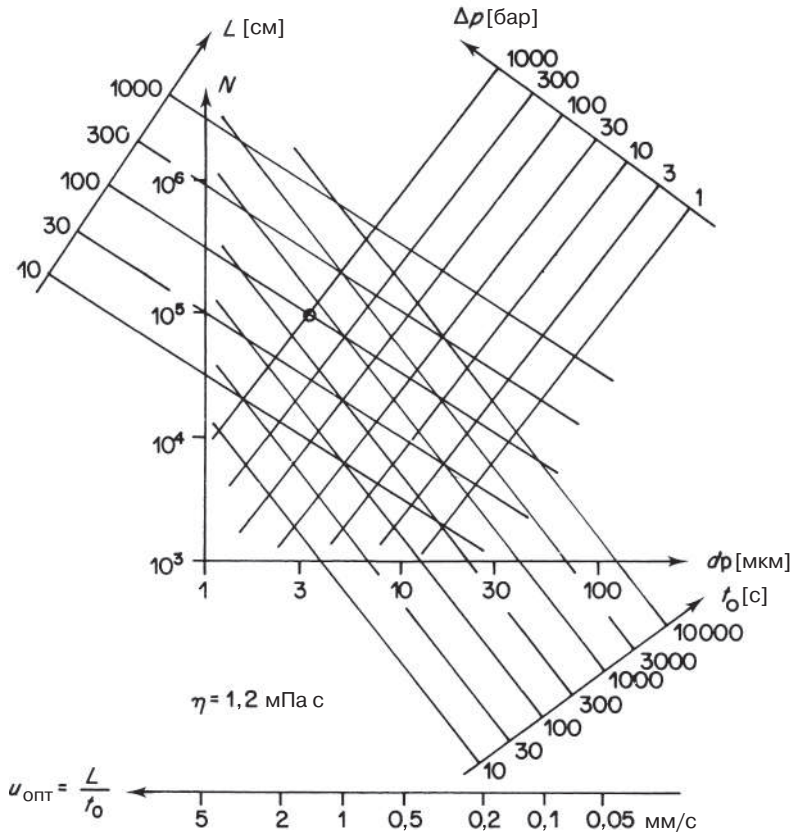


Рис. 2.30. Оптимальные параметры для подвижных фаз высокой вязкости

конкретной задачи разделения. Также они формируют представление о возможностях ВЭЖХ для тех, кто понимает, как их интерпретировать.

Задача 13

Определить число теоретических тарелок в оптимальных условиях (низкая вязкость элюента) при давлении 10 бар и размере частиц силикагеля 10 мкм.

Решение

На рис. 2.29 эти условия отмечены кружком, по которому видно, что для $N = 10000$: $L = 30$ см, $t_0 = 300$ с, $u_{\text{опт}} = 1$ мм/с.

Задача 14

Рабочее давление насоса 1000 бар. Рассчитать оптимальные условия, при которых число теоретических тарелок будет равно 100 000 (для вязких элюентов).

Решение

На рис. 2.30 ответ на эту задачу обозначен кружком. $d_p = 3,5$ мкм, $L = 100$ см, $t_0 = 700$ с, $u_{\text{опт}} = 1,4$ мм/с.

В таких разделениях требуемое число теоретических тарелок N определяется коэффициентом селективности α_{\min} «критической пары пиков», т.е. теми двумя веществами из смеси, которые сложнее всего разделить. Следовательно, оптимальную методику разделения можно разработать только на основе α_{\min} ¹.

Исчерпывающее представление о «возможностях ВЭЖХ» было дано в статье G. Guichon «The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography»².

2.11. Как определить пиковую емкость

С практической точки зрения пиковая емкость (раздел 2.8) гораздо важнее числа теоретических тарелок. Чтобы решать аналитические задачи или разделять максимально возможное количество пиков, необходимо знать пиковую емкость. Взглянув на диаграммы Халаша на рис. 2.29 и 2.30, становится до некоторой степени ясно, что аналитик волен сам выбирать, как работать: быстро на коротких колонках с маленьким размером частиц или медленно на длинных колонках с крупными частицами. Разница заключается только в рабочем давлении. На рис. 2.31 изображена диаграмма, аналогичная рис. 2.30, с небольшими

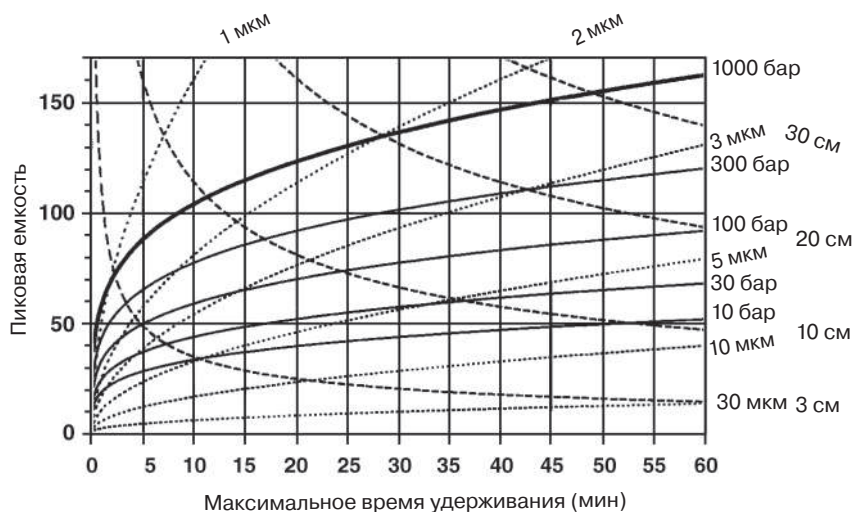


Рис. 2.31. Зависимость пиковой емкости от времени анализа. Графики представлены для изократического обращенно-фазового разделения в минимуме кривой Ван-Деемтера. Максимальное значение коэффициента емкости 20, т.е. максимальное время анализа $21t_0$, затем анализ прекращается. Представленные кривые только для малых молекул с коэффициентом диффузии примерно $1 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$, а не для макромолекул. Точечными линиями представлен размер частиц, прерывистыми — длина колонки, сплошными — давление

¹ R. P. W. Scott, *J. Chromatogr.*, **468**, 99 (1989).

² G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **1126**, 6 (2006).

изменениями. Теперь на ней присутствуют в качестве интересующих параметров пиковая емкость и продолжительность анализа¹. Диаграмма предназначена для ОФ разделений в изократическом режиме, вязкость элюента — 1,2 мПа·с, общая пористость сорбента — 0,70 (раздел 8.3), а используемые колонки работают в оптимальной области кривой Ван-Деемтера, максимальное давление 1000 бар. В правой части диаграммы, например, видно, что на колонке длиной 20 см с частицами 4 мкм за 1 ч можно достигнуть пиковой емкости 90. (Это более чем в 2 раза больше пиковой емкости 41, рассчитанной в задачах 10, 11.) На колонке длиной 3 см с частицами примерно 2,5 мкм за 5 мин при давлении 100 бар можно получить пиковую емкость 50 либо при давлении не более 30 бар на 10-сантиметровой колонке с 5 мкм частицами за 40 мин.

Пиковая емкость в нормально-фазовых separations при таком же давлении может быть выше или она будет одинаковой при более низком давлении, поскольку вязкость элюента меньше. При 20 °C вязкость гексана составляет 0,33 мПа·с (раздел 5.1). Вместо давления можно также сравнить продолжительность анализа. При одинаковой пиковой емкости и одинаковом давлении нормально-фазовые separations проходят быстрее обращенно-фазовых.

В градиентных режимах пиковая емкость гораздо выше, чем в изократических.

¹ V. R. Meyer, *J. Chromatogr. A*, **1187**, 138 (2008).

ГЛАВА 3

НАСОСЫ

3.1. Общие требования

ВЭЖХ-насос объединяет в себе две различные функции. Это должно быть надежное устройство, способное качать элюент под давлением до 350 или даже до 500 бар¹. Вместе с тем насос должен обеспечивать подачу элюента точно и воспроизводимо при любой заданной скорости потока. Диапазон скоростей потока обычно находится между 0,1 мл/мин и 5 или 10 мл/мин, и внутри него может быть установлена любая скорость с инкрементом в 0,1 мл/мин². Установленная скорость потока не должна зависеть от давления в системе, если оно, как это обычно и случается в процессе градиентной элюции, изменяется в ходе разделения. Более того, поток должен быть без пульсаций, особенно в тех случаях, когда используется рефрактометрический, кондуктометрический или электрохимический детектор.

Другие, более практические требования относятся к простоте в эксплуатации. Насос должен быть готов к использованию после совершения простых действий, включающих заполнение головы насоса (т. е. промывку и заполнение клапанов новым элюентом). Внутренний объем головы насоса должен быть мал, чтобы обеспечить быструю смену элюента. При этом необходимо иметь некоторый дополнительный объем для подавления пульсаций³. Все работы по поддержанию насоса в рабочем состоянии и ремонту должны быть простыми и легко выполняться.

Необходимо отметить здесь еще раз, что высокое давление само по себе не то, ради чего затевалось ВЭЖХ. К сожалению, высокое давление обусловлено тем, что подвижная фаза есть жидкость с достаточно высокой вязкостью, которую необходимо продавить сквозь плотно упакованный сорбент, состоящий из очень мелких частиц. Чем мельче частицы, тем короче диффузионные пути и, таким образом, тем больше количество теоретических тарелок на метр.

3.2. Короткоходовый плунжерный насос

Обычный тип ВЭЖХ-насоса — это так называемый короткоходовый плунжерный насос. Общий принцип, хотя и упрощенный, показан на рис. 3.1. Подвижная

¹ Теперь уже и до 1300 бар в случае систем для УВЭЖХ. — *Прим. пер.*

² В современных насосах инкремент может быть и меньше 0,001 мл/мин. — *Прим. пер.*

³ В современных насосах подавление пульсаций происходит, как правило, с помощью электроники. — *Прим. пер.*

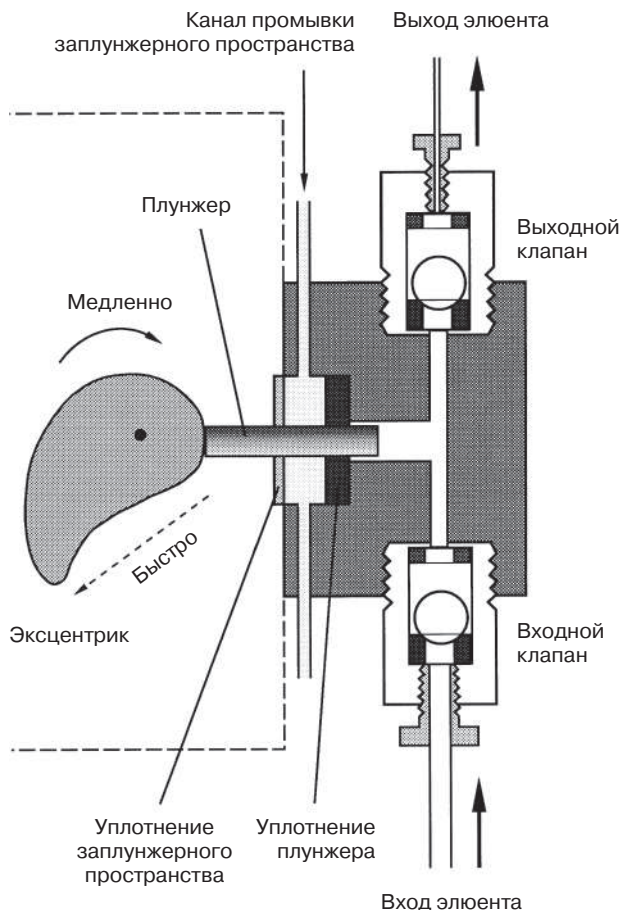


Рис. 3.1. Принцип работы короткоходового плунжерного насоса

фаза продавливается плунжером в нужном направлении, в то время как клапаны открывают и закрывают путь, по которому идет жидкость. Они изображены в той части рисунка, которая закрашена темно-серым¹.

Движущей силой процесса является шаговый двигатель, который вращает закрепленный на его валу диск или эксцентрик. Последний толкает плунжер вперед или назад². С каждым ходом поршень прокачивает небольшое количество жидкости, обычно 100 мкл³. Клапаны сконструированы таким образом, что они закрываются, когда давление направлено сверху, и открываются, когда давление снизу превышает давление сверху. Схема движения плунжера и открытия/закрытия клапанов представлена на рис. 3.2. Используются также

¹ То есть в голове насоса. — *Прим. пер.*

² Это происходит в том случае, если плунжер жестко связан с эксцентриком. Обычно такой жесткой связи, которая изображена на рисунке, не делают, а в обратное направление плунжер возвращает пружина. — *Прим. пер.*

³ В современных насосах и менее этого объема. — *Прим. пер.*

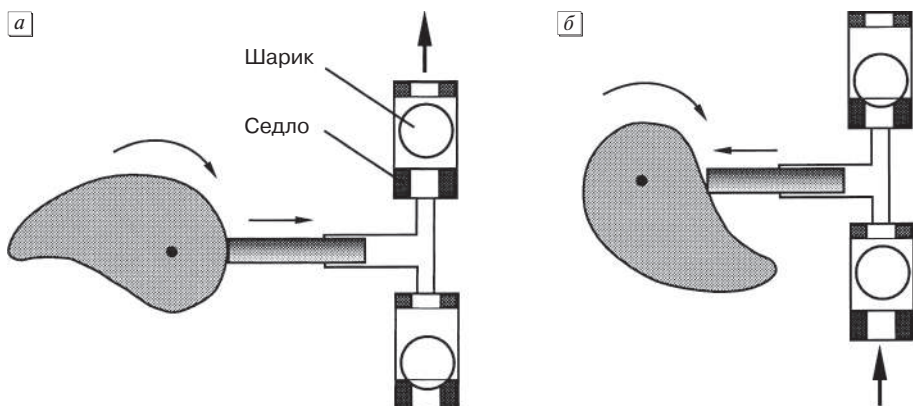


Рис. 3.2. Этап нагнетания (а) и этап наполнения (б)

клапаны с электрическим приводом, поскольку они имеют преимущества при работе с низкими скоростями потока.

С кулачком в виде диска и равномерно работающим шаговым двигателем на выходе из насоса мы будем получать прерывистый, пульсирующий поток:



Для получения непрерывного, насколько это возможно, потока кулачок должен иметь неправильную форму и вращаться в соответствии со специальной временной программой, управляющей его позиционированием. Когда элюент нагнетается, кулачок (и толкаемый им поршень) движется медленно; форма кулачка при этом гарантирует постоянный поток. В момент обратного хода, когда жидкость засасывается в насос, кулачок (и связанный с ним поршень) движется быстро, что приводит к краткому, насколько это возможно, прерыванию потока:



Кулачок может быть заменен электронно-управляемым линейным валом. Оптимальный постоянный расход, таким образом, может быть получен с помощью хорошо отлаженного программного обеспечения. Такие насосы, однако, существенно дороже обычных.

Пульсации потока могут быть сглажены при использовании двух плунжеров, работающих параллельно, но в разных направлениях. Еще один вариант конструкции предполагает два последовательных плунжера, первый из которых за один ход нагнетает в линию чуть больше жидкости, чем второй. Это позволяет компенсировать сжимаемость подвижной фазы и помогает подавить кавитацию, т.е. образование пузырьков во время заполнения головы насоса жидкостью. В некоторых насосах используют двухступенчатые клапаны, т.е. ставят наверху одной клапанной пары еще одну (шарик и седло). Электроника насосов тоже устроена таким образом, чтобы компенсировать сжимаемость элюента (она, к счастью, низкая, к примеру 1 % на 100 бар).



Плунжер сделан из сапфира или из керамики и поэтому хрупок: уронишь на пол — и разобьется. Впрочем, при нормальной работе насоса плунжеры ломаются крайне редко. Если элюент, содержащий соли, останется в голове насоса, то растворитель может испариться, и внутри вырастут кристаллы. Когда насос после перерыва в работе будет снова включен, то поверхность плунжера будет поцарапана и расход больше не будет точным¹. Уплотнения плунжеров сделаны из полимера, например из графитонаполненного фторопласта, и часто снабжены пружиной, которая видна только с одной стороны². Таким образом ориентация уплотнения очень важна при его замене³. Уплотнение сконструировано так, чтобы выдерживать высокое давление, на которое рассчитан насос, но вместе с тем оно чуть-чуть подтекает. Подтекающая подвижная фаза используется для смазки плунжера и для того, чтобы само уплотнение не теряло своей эластичности. Большинство выпускаемых сегодня насосов имеют специальный промывочный канал, в котором жидкость (обычно это вода) циркулирует время от времени и омывает плунжер от буферных солей или абразивных материалов, приносимых в процессе прокачивания элюента. Этот промывочный канал и сам по себе нуждается в уплотнении, тоже фторопластовом, работающем при обычном давлении.

Шарики в клапанных парах рубиновые, а седла в них сапфировые. Когда шарик садится на седло, он соприкасается с ним лишь по тонкой кольцевой линии уплотнения. Если частичка пыли или кристалл из элюента попадет на эту линию, клапан будет подтекать. Это одна из причин, по которой подвижную фазу надо очень тщательно фильтровать от всякого рода механических загрязнений и частиц.

3.3. Обслуживание и ремонт

Насос — это точный инструмент и за ним необходимо ухаживать точно так же, как и за аналитическими весами. Нужно следовать всем рекомендациям, указанным в руководстве пользователя. Даже если насос работает отлично, время от времени ему необходимо обслуживание. О том, как его обслуживать, надо заранее справиться в руководстве пользователя.

Периодически кулачку необходима смазка. Смазывайте согласно инструкции. При обслуживании головы насоса необходимо работать аккуратно и использовать только те инструменты, которые для этого предназначены.

Профилактические работы с насосом необходимо проводить на чистом рабочем столе, используя подходящие инструменты. Кроме того, понадобятся салфетки, растворитель для промывки и стакан или поднос с невысокими бортиками, который нужно подставить под насосную головку, чтобы предохранить

¹ На самом деле, наибольшей опасности в этом случае подвергаются уплотнения плунжера, сделанные из гораздо более мягкого материала. — *Прим. пер.*

² Пружина эта браслетная и вставлена в уплотнение для того, чтобы как можно плотнее прижимать внутреннюю поверхность уплотнения к плунжеру. — *Прим. пер.*

³ Та сторона, с которой видно уплотнение, обычно должна быть направлена к противоположному от привода концу плунжера. — *Прим. пер.*

плунжеры от падения на пол и чтобы потом не искать по полу укатившиеся неизвестно куда шарики из клапанных пар.

Уплотнения плунжеров со временем приходят в негодность и требуют замены, например раз в год¹. Для этого необходимо отсоединить голову от основной части насоса. Пришедшие в негодность уплотнения удаляют специальным инструментом, который поставляется вместе с насосом. Не извлекайте уплотнения из головы насоса подручными инструментами вроде отвертки — вы поцарапаете саму голову², и это приведет к утечке элюента! Новые уплотнения вставляются на свои посадочные места в голове тоже с помощью специального инструмента. Очень важно в этом вопросе скрупулезно следовать инструкции. Не перепутайте стороны уплотнения. Учтите, что уплотнение, вставленное неправильной стороной, должно быть удалено и заменено. Его уже нельзя будет использовать. Новые уплотнения нужно сначала использовать при низких скоростях потока и без подсоединенной колонки. Воду на этом этапе следует избегать, чтобы не испортить уплотнение. Хорошо подходят в таких случаях изопропанол и метанол.

Засорившиеся или подтекающие клапаны³ можно привести в рабочее состояние с помощью обработки в ультразвуковой бане. Весьма возможно, что придется использовать ряд растворителей для промывки клапанов, например таких, как водный раствор детергента, тетрагидрофуран или хлористый метилен. Некоторые клапанные пары не имеют собственного корпуса и при извлечении из головы насоса могут буквально развалиться в руках (не потеряйте шарики!), некоторые имеют разборный корпус, а некоторые неразборный. В первых двух типах клапанов можно заменить негодные шарики или седла, если они поцарапаны и уже не могут не пропускать жидкость. Неразборные клапанные пары, если они должным образом не работают, надо менять целиком в том случае, если обработка в ультразвуковой бане не помогла.

Два самых важных совета:

- а) насос никогда не должен работать всухую!
- б) не выключайте насос, когда его голова заполнена буферным раствором. Всегда после буфера промойте голову насоса водой; если вам нужно, то замените потом воду на органический растворитель. Если предполагается потом долгое время не пользоваться насосом, заполните его в конечном счете 10% органическим растворителем, чтобы предотвратить рост микроскопических водорослей.

¹ В инструкциях к современным насосам указан не временной промежуток, что не совсем правильно, поскольку за год насос может проработать в разных случаях совершенно разное время, а количество литров элюента, которое может прокачать насос, прежде чем уплотнение необходимо будет поменять. Это гораздо более адекватная оценка ситуации. — *Прим. пер.*

² Нержавеющая сталь или титановые сплавы, из которых изготавливают насосные головы, довольно мягкие материалы. — *Прим. пер.*

³ J.W. Dolan, *LC GC Eur.*, **19**, 140 (2006) и **21**, 514 (2008) or *LC GC North Am.*, **24**, 132 (2006) и **26**, 532 (2008).

3.4. Другие конструкции насосов

В специальной конструкции короткоходового плунжерного насоса плунжер не вступает в непосредственный контакт с перекачиваемой подвижной фазой. Он движется в заполненном маслом канале и масло отделено от элюента специальной мембраной. Таким образом, плунжер не контактирует с подвижной фазой, которая может быть агрессивной. При этом элюент не будет загрязнен абразивными частицами, привносимыми в процесс плунжером¹.

Для очень малых скоростей потока можно использовать насос, который перекачивает жидкость не при помощи частых возвратно-поступательных движений плунжера, а действует как шприцевой дозатор-переросток. Медленнодвигающийся поршень выталкивает элюент непосредственно из резервуара, в котором он находится. Поток этого элюента напрочь лишен пульсаций. Резервуар с элюентом имеет конечный объем, например 10 мл, и, если у вас однопоршневая конструкция, время от времени хроматографический процесс приходится останавливать и перезаряжать шприц. Все эти манипуляции будет гораздо удобнее проводить, если использовать конструкцию из двух шприцев, один из которых выдавливает в систему элюент, а второй при этом наполняется. Как только поршень первого шприца достигнет конечной точки и выдавит весь элюент, за дело принимается второй. Однако при помощи шприцевых насосов градиента не сделать².

Для скоростей потока порядка микролитр в минуту коммерчески доступны двухплунжерные насосы. С их помощью можно формировать достаточно прецизионные градиенты на стороне высокого давления с общей скоростью потока 50 мкл/мин или выше.

Для упаковки колонок или для тех случаев, когда требуется давление более 500 бар, используются пневматические усилители насосов³. Благодаря особой конструкции относительно низкое давление газа действует на один из концов плунжера с большей площадью, а другой конец плунжера с гораздо меньшей площадью контактирует с элюентом. При одинаковой силе по обе стороны плунжера давление выше там, где меньше площадь сечения, в соответствии с отношением двух площадей. Можно усилить давление в 70 раз. Это означает, что давление газа в 10 бар можно преобразовать в давление 700 бар для элюента.

Для препаративных разделений есть коммерчески доступные насосы, способные перекачивать элюент со скоростью 300 мл/мин даже при давлении 300 бар.

¹ Мембранно-плунжерные конструкции хороши и даже очень, но не в тех случаях, когда идет речь о высоких и сверхвысоких давлениях, необходимых для УВЭЖХ. — *Прим. пер.*

² Если этих насосов больше одного, то сделать можно. — *Прим. пер.*

³ В настоящее время такие насосы с пневматическими усилителями используются в препаративной хроматографии и при упаковке колонок. — *Прим. пер.*

ГЛАВА 4

ПОДГОТОВКА ОБОРУДОВАНИЯ К НАНЕСЕНИЮ ОБРАЗЦА

4.1. Выбор подвижной фазы

Подвижную фазу необходимо выбирать с учетом ее хроматографических свойств: она должна так взаимодействовать с соответствующим сорбентом, чтобы разделить смесь веществ как можно быстрее и эффективнее. Как правило, для решения любого частного случая найдется целый ряд растворителей. Их выбор должен основываться на следующих критериях.

- а) *Вязкость*: у растворителей с низкой вязкостью перепад давления при определенной скорости потока меньше, чем у растворителя с бóльшей вязкостью. Низкая вязкость также позволяет ускорить процесс хроматографирования благодаря увеличению скорости массопереноса. Единицу динамической вязкости растворителя η выражают через миллипаскаль-секунда (мПа·с; ранее через сантипуазы — сП, при тех же значениях).
- б) *УФ-прозрачность*¹: если используется УФ-детектор, подвижная фаза должна быть прозрачной на требуемой длине волны. Например, этилацетат непригоден для детектирования при 254 нм, так как недостаточно оптически прозрачен до 275 нм (менее 10 % абсорбции). Необходимо учитывать также поглощение в УФ буферных солей, ион-парных реагентов и других добавок.
- в) *Показатель преломления*: важен только при использовании рефрактометрического детектора. Разница между показателями преломления растворителя и вещества должна быть как можно большей при работе на пределе обнаружения.
- г) *Точка кипения*: низкокипящие элюенты необходимы, если элюат идет на дальнейшую обработку. Тем самым уменьшают потери при упаривании подвижной фазы из фракций, чувствительных к температуре веществ. Однако растворители с высоким давлением паров при рабочей температуре могут образовывать пузырьки пара в детекторе.

¹ C. Seaver and P. Sadek, *LC GC Int.*, 7, 631 (1994).

- д) *Чистота*: значение этого критерия зависит от намеченных задач: первое, отсутствие веществ, которые могли бы быть помехой при выборе способа детекции; второе — отсутствие веществ, которые мешали бы градиентной элюции (см. рис. 18.6); и третье — отсутствие нелетучих примесей в случае препаративного разделения (см. задачу 43 в разделе 21.4). Например, гексан для ВЭЖХ не обязательно должен быть только чистым *n*-гексаном, он может содержать и разветвленные изомеры, так как элюирующие свойства от этого не меняются (но бензол должен отсутствовать даже в следовых количествах, если используется УФ детекция).
- е) *Инертность по отношению к веществам образца*: подвижная фаза не должна реагировать с соединениями, входящими в состав образца (осторожно с перекисями!). Если образцы содержат высокочувствительные к окислению вещества, возможно, понадобится добавление антиоксиданта: 0,05 % 2,6-ди-*трет*-бутил-*p*-крезола (БГТ). БГТ легко удаляется из элюента при упаривании, но он поглощает в УФ ниже 285 нм.
- ж) *Отсутствие корродирующих свойств*¹: на свету из хлорсодержащих растворителей выделяется HCl. Вода, даже в следовых количествах, образует с хлористым водородом соляную кислоту, которая разрушает нержавеющую сталь. Коррозия усиливается в присутствии полярных растворителей. Такие смеси, как тетрагидрофуран-четырёххлористый углерод или метанол-четырёххлористый углерод, крайне реакционноспособны. Все соединения, образующие комплексы с железом, такие как хлориды, бромиды, иодиды, ацетаты, цитраты или формиаты (буферные соли!), обладают корродирующими свойствами. Буферы на основе солей лития также вызывают сильную коррозию при низких pH². Сталь может корродировать даже от метанола или ацетонитрила³. Возможно, потребуется поверхностная пассивация системы азотной кислотой⁴ или изменение ее конструкции⁵ при необходимости. В любом случае, после использования подвижной фазы, содержащей хлорированные растворители или солевой буфер, рекомендуется промывка растворителем, свободным от галоген- и других ионов.
- з) *Токсичность*: в данном случае это обязанность каждой лаборатории настолько возможно избегать использования токсичных реагентов. Хлорсодержащие растворители могут выделять крайне ядовитый газ фосген. Бензол (канцероген) следует всегда, где только возможно, заменять толуолом.
- и) *Стоимость*!

Основное правило: подвижная фаза не должна мешать детектированию, т.е. не должна обладать свойством, которое используется для детектирования (исключение — не прямое детектирование, см. раздел 6.9). В противном случае

¹ K. E. Collins *et al.*, *LC GC Eur.*, **13**, 464 и 642 (2000) или *LC GC Mag.*, **18**, 600 и 688 (2000).

² P. R. Haddad and R. C. L. Foley, *J. Chromatogr.*, **407**, 133 (1987).

³ R. A. Mowery, *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 22 (1985).

⁴ R. Shoup and M. Bogdan, *LC GC Int.*, **2** (10), 16 (1989) или *LC GC Mag.*, **7**, 742 (1989).

⁵ M. V. Pickering, *LC GC Int.*, **1** (6), 32 (1988).

возникает вероятность появления нежелательных изменений базовой линии или дополнительных пиков на хроматограмме. Однако этой рекомендации невозможно следовать при использовании детекторов общих характеристик, таких как рефрактометрический детектор.

Свойства растворителей перечислены в разделе 5.1.

4.2. Приготовление подвижной фазы

Тщательный выбор подвижной фазы должен сопровождаться ее тщательной подготовкой.

Как правило, наилучшим выбором является использование растворителей и реактивов, которые продаются под маркой «HPLC grade» или сходного качества. Это касается и воды, если ее качество, получаемое с помощью лабораторной системы водоочистки, неудовлетворительное. Растворители класса «HPLC grade» гарантируют наибольшую прозрачность в УФ и отсутствие пиков примесей при градиентном разделении. Если растворители такого качества недоступны, то менее чистые растворители необходимо очистить фракционной перегонкой либо адсорбционной хроматографией¹.

Способ приготовления подвижной фазы или буферов должен быть детально описан. Свойства элюента могут зависеть от последовательности необходимых подготовительных шагов, таких как растворение различных солей, доведение pH или внесение неионогенных добавок. При смешивании воды и метанола (до некоторой степени и других смешиваемых с водой растворителей) проявляется эффект объемного сжатия: объем смеси становится меньше, чем сумма отдельно взятых объемов. Следовательно, необходимо отмерять объемы двух растворителей отдельно до их смешивания.

Если элюент не используется сразу из емкости, в которой поставляется, то его необходимо отфильтровать через 0,5- или 0,8-мкм фильтры непосредственно перед использованием². Всегда существует опасность присутствия частиц, которые могут повредить клапаны насосов, засорить капилляры и фильтры или закупорить колонку. Используйте фильтрующие материалы, инертные по отношению к используемому растворителю.

По разным причинам элюенты, используемые в ВЭЖХ, должны быть дегазированы, особенно полярные элюенты (вода, буферные растворы, все другие водные смеси, смешиваемые с водой органические растворители), которые могут растворять достаточно большое количество воздуха³. Иначе могут возникнуть проблемы: при низком противодавлении в ячейке детектора будут появляться пузырьки газов, базовая линия будет с шумами или утыкана лишними пиками, точность анализа может пострадать, а пики могут уменьшиться из-за того, что растворенный кислород поглощает при малых длинах волн и гасит

¹ Детальная инструкция дана в: *Purification of Solvents with ICN Adsorbents*, ICN Biomedicals, P.O. Box 1360, D-37269 Eschwege, Germany.

² В случае использования растворителей HPLC-grade подвижную фазу необходимо фильтровать только в том случае, если она содержит соли. — *Прим. пер.*

³ J. W. Dolan, *LC GC Eur.*, **12**, 692 (1999) or *LC GC Mag.*, **17**, 908 (1999).

флюоресценцию. Градиентное разделение становится весьма чувствительным, так как при смешивании растворителей, содержащих воздух, начинают высвобождаться пузырьки газа.

Подвижную фазу можно дегазировать вне хроматографической системы, помещая емкость с элюентом в ультразвуковую баню под вакуумом на 1 мин. Этого хватит для нормальной работы в течение нескольких часов при невысоких требованиях к точности анализа. С ион-парными реагентами могут возникнуть затруднения из-за вспенивания. Удобнее (и дороже) непрерывная дегазация: либо постоянная продувка гелием (гелий намного менее растворим, чем остальные газы), либо с помощью дегазирующего модуля. В таких устройствах подвижная фаза проходит сквозь мембрану, которая позволяет газу проникать в окружающий вакуум. У этих мембран довольно большой внутренний объем, что является недостатком при необходимости смены элюента.

Растворители и элюенты не следует¹ хранить в пластиковых емкостях, так как пластификаторы и другие низкомолекулярные соединения могут диффундировать в жидкость. Емкости с элюентами должны быть всегда закрыты — либо герметично при хранении, либо негерметично при использовании. На рис. 4.1 представлен резервуар, подающий растворитель, со всевозможными аксессуарами: подогревом (при термостатировании), обратным холодильником, магнитной мешалкой, вакуумным насосом, линией инертного газа и датчиком перегрева.

Уровень жидкости в емкости должен постоянно контролироваться. Не позволяйте насосам работать всухую, иначе это может привести к сильным механическим повреждениям. Линия, питающая насос, должна быть как можно большего диаметра (около 2 мм).

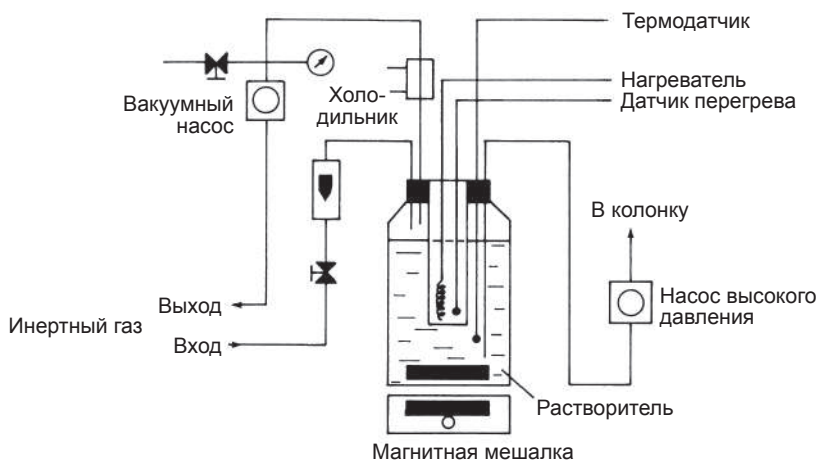


Рис. 4.1. Подготовка растворителей (воспроизведено с разрешения Хьюлетт-Паккард)

¹ За исключением ионной хроматографии. — Прим. пер.

4.3. Градиентные системы

Если разделяют сложную смесь соединений, то состав подвижной фазы, возможно, придется менять по мере продвижения образца по колонке. Изменения должны сопровождаться повышением элюирующей силы подвижной фазы таким образом, чтобы ускорить продвижение поздно элюируемых или совсем не вымываемых с колонки пиков. В зависимости от конструкции градиентные системы можно разделить на два типа: с градиентом на стороне низкого и с градиентом на стороне высокого давления, т.е. со смешиванием растворителей до или после насоса.

Например, *градиентная система на стороне низкого давления* (рис. 4.2, сверху) состоит из крана с дозирующими клапанами, к которому подсоединены две или более емкости. После крана стоит камера смешения (объемом не более 1 мл), снабженная магнитной мешалкой¹. Емкости содержат растворители, различающиеся элюирующей силой. Клапаны открываются с разной периодичностью таким образом, чтобы состав элюента в перемешивающем устройстве менялся. Насос подает перемешанный элюент к инжектору и колонке. В такой системе растворители перемешиваются на стороне низкого давления до входа в насос, поэтому употребляют термин «градиентная система низкого давления». Она относительно недорога, но дозирующие клапаны необходимо контролировать очень тщательно. Объем задержки (см. ниже) может быть довольно большим и не редки проблемы, возникающие из-за пузырьков воздуха.

В *градиентных системах высокого давления* (рис. 4.2, внизу) требуются два или три насоса для подачи разных растворителей (которые, конечно же, должны смешиваться друг с другом). Вначале с большей скоростью работает насос,

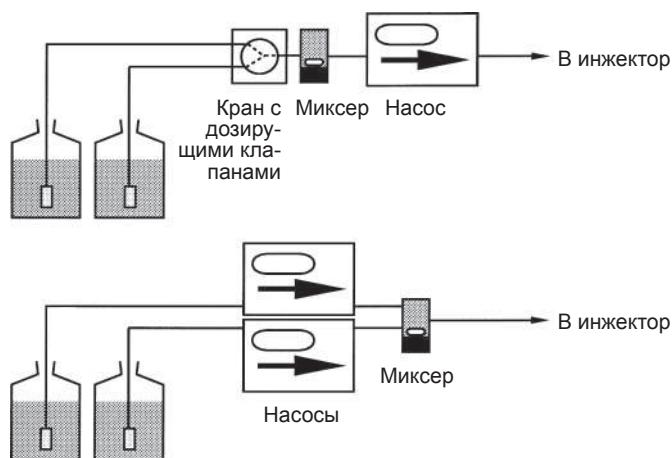


Рис. 4.2. Градиентная система низкого (вверху), и высокого (внизу) давления

¹ В современных аналитических системах, как правило, установлены статические миксеры без магнитных мешалок. — Прим. пер.



подающий слабый элюент (либо только он), а насос, подающий сильный элюент, перекачивает меньше (или совсем не работает). Скорость потока каждого насоса линейно или экспоненциально изменяется либо плавно, либо ступенчато. Система электронного контроля отслеживает, чтобы общий объем оставался всегда постоянным¹. Здесь смешивание растворителей происходит на стороне высокого давления, за насосами, поэтому такая конструкция известна под названием «градиентная система высокого давления». Поскольку здесь требуется на каждый растворитель по насосу, она достаточно дорогая. Объем задержки у нее небольшой.

*Объем задержки*² — это объем в системе ВЭЖХ от точки смешивания растворителей до входа на колонку. В градиентных системах низкого давления в него входят объемы дозирующих клапанов, миксера, головы насоса, инжектора и соединительных капилляров. В системах высокого давления он меньше, так как состоит только из объемов миксера, инжектора и капилляров.

Иметь большой объем задержки довольно невыгодно. Он задерживает и искажает градиент, требует длительного уравнивания между разделениями. Большие объемы задержки не подходят для низких скоростей потока.

4.4. Капилляры

Для соединения различных частей хроматографической системы используются обычно капилляры с внешним диаметром около 1/16 дюйма (1,6 мм). Внутренний диаметр может составлять 0,1; 0,25; 0,50; 1,0 мм (в дюймах: 0,007; 0,01; 0,02; 0,04), а может быть иным. Для всех соединений в системе, не контактирующих с образцом, предпочтительно использовать капилляры с внутренним диаметром 1 мм. Они, как правило, не закупориваются и обладают минимальным сопротивлением потоку. Внутренний объем их составляет 0,8 мл/м. Для всех критически важных соединений, которые влияют на внеколоночные объемы, т. е. соединений между инжектором и колонкой, а также между колонкой и детектором, необходимо использовать капилляры диаметром 0,18 или 0,25 мм^{3,4}. Внеколоночные объемы намного уменьшаются при использовании капилляров диаметром 0,18 мм (23 мкл/м) и менее, но они требуют тщательной фильтрации подвижной фазы и образцов, для того чтобы предотвратить засорение. Капилляры диаметром 0,25 мм менее требовательны, но их не рекомендуют использовать с колонками, которые дают очень узкие пики.

Основные вопросы, связанные с внеколоночными объемами в ВЭЖХ-системах, обсуждались в разделе 2.6. Предложены разные формулы, которые позволяют рассчитать максимально допустимую длину капилляров во избежание

¹ На самом деле, система электронного контроля учитывает только общий расход, поскольку учитывать изменения объема при смешивании она не может. — *Прим. пер.*

² L. R. Snyder and J. W. Dolan, *LC GC Int.*, **3** (10), 28 (1990).

³ Для современных аналитических систем используются капилляры и меньшего внутреннего диаметра 0,12 и 0,07 мм. — *Прим. пер.*

⁴ *LC GC North Am.*, **24**, 1078 (2006).

размывания полосы вещества. Модифицированная формула М. Мартина и др. приведена ниже¹:

$$l_{\text{кап}} (\text{см}) = 4 \cdot 10^{10} \frac{F (\text{мл} \cdot \text{мин}^{-1}) \cdot t_R^2 (\text{мин}) \cdot D_m (\text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1})}{d_{\text{кап}}^4 (\text{мм}) \cdot N},$$

где F — это объемная скорость потока, t_R — время удерживания интересующего пика, D_m — коэффициент диффузии растворенного вещества в подвижной фазе, $d_{\text{кап}}$ — внутренний диаметр капилляра, а N — число теоретических тарелок пика. При длине капилляра, вычисленной по этой формуле, уширение пика составляет не более 5 %.

Для грубой оценки длины капилляра (это уравнение только для этой оценки и предназначено) значение коэффициента диффузии для малых молекул принимается равным $1 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Тогда уравнение в упрощенном виде будет выглядеть так:

$$l_{\text{кап}} (\text{см}) = 40 \frac{F (\text{мл} \cdot \text{мин}^{-1}) \cdot t_R^2 (\text{мин})}{d_{\text{кап}}^4 (\text{мм}) \cdot N}.$$

Отметим, что размывание пика увеличивается в четыре степени с увеличением внутреннего диаметра капилляра! Следовательно, допускается использовать довольно длинные капилляры, если они достаточно узкие. В аналитических разделениях не рекомендуется использовать капилляры с внутренним диаметром 0,5 мм для критических соединений.

Задача 15

При скорости потока 1 мл/мин время удерживания пика составляет 2,6 мин на колонке с 7900 теоретическими тарелками. Какова максимальная длина капилляра при допустимом уширении пика до 5 %, если его внутренний диаметр равен 0,25 или 0,18 мм?

Решение

$$l_{\text{кап}} = 40 \frac{1 \cdot 2,6^2}{0,25^4 \cdot 7900} \text{ см} = 9 \text{ см для } 0,25\text{-мм капилляра}.$$

По аналогичному расчету для 0,18-мм капилляра получим 33 см.

По сравнению с давлением, обусловленным сопротивлением колонки, давление Δp , создаваемое капиллярами, невысоко. Его можно рассчитать по уравнению Хагена — Пуазейля (при ламинарных потоках), которое при записи в единицах, принятых в ВЭЖХ, выглядит так:

$$\Delta p_{\text{кап}} (\text{бар}) = 6,8 \cdot 10^{-3} \frac{F (\text{мл} \cdot \text{мин}^{-1}) \cdot l_{\text{кап}} (\text{м}) \cdot \eta (\text{мПа} \cdot \text{с})}{d_{\text{кап}}^4 (\text{мм})},$$

где F — объемная скорость потока, а η — вязкость элюента. Коэффициент перерасчета Δp в кПа составляет 0,68.

¹ M. Martin, C. Eon and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, **108**, 229 (1975).

Задача 16

Рассчитайте давление, создаваемое потоком воды, проходящей со скоростью 2 мл/мин через капилляры длиной 0,8 м и внутренним диаметром 0,25 мм.

Решение

Вязкость воды равна 1 мПа·с (раздел 5.1).

$$\Delta p_{\text{кап}} = 6,8 \cdot 10^{-3} \frac{2 \cdot 0,8 \cdot 1}{0,25^4} \text{ бар} = 2,8 \text{ бар}.$$

Что касается материала капилляров, то можно выбрать сталь, тефлон или ПЭЭК. Сталь выдерживает большие давления и в основном устойчива к коррозии (исключения приведены в разделе 4.1). Нельзя утверждать, что сталь биосовместима, поскольку она может адсорбировать белки. Тефлон выдерживает только небольшое давление и температуру, поэтому его не везде можно применять. ПЭЭК (см. рис. 4.3) может заменить сталь, но необходимо учесть его ограниченную устойчивость к давлению и агрессивным химикатам. Он чувствителен к хлористому метилу, тетрагидрофурану, диметилсульфоксиду и концентрированным азотной и серной кислотам. Материал является биосовместимым. Верхний предел по давлению составляет около 200 бар, хотя некоторые производители заявляют 350 бар. Капилляры ПЭЭК маркируют цветом в зависимости от их внутреннего диаметра: желтым — 0,18 мм, синим — 0,25 мм, оранжевым — 0,5 мм, серым — 1,0 мм. Капилляры Ultrapek и Carbon Peek несколько отличаются по химическому составу от ПЭЭК, что обеспечивает лучшую устойчивость к повышенным давлениям и агрессивным химикатам.

Рекомендуется пластиковые капилляры использовать только с пластиковыми фитингами, затягивающимися вручную. При применении стальных фитингов существует опасность затянуть их слишком сильно и повредить капилляр.

Тефлоновые и ПЭЭК капилляры легко режутся бритвенными лезвиями, но есть и специальные режущие инструменты. Сталь разрезать трудно, так как тонкостенные трубки склонны к деформации, а толстостенные — к закупориванию или сужению своего внутреннего диаметра. Лучше использовать специальные инструменты, которые поставляются производителями капилляров, и разрезать, следуя инструкции. Если нет под рукой таких инструментов, то напильником нужно процарапать бороздку по окружности капилляра, затем зажать капилляр двумя плоскогубцами или с одной стороны тисками и плоскогубцами с другой как можно ближе к бороздке и перегибать капилляр взад-вперед до тех пор, пока он не переломится. Если к прибору подсоединяется только что разрезанный капилляр, для начала прикрепите его разрезанным концом в направлении потока от насоса, не подсоединяя к остальной части прибора, чтобы промыть его от возможных твердых частичек и пыли.

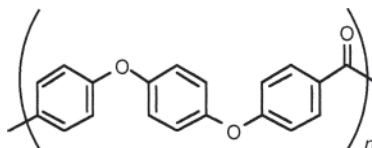


Рис. 4.3. Химическая формула ПЭЭК (полиэфирэфиркетон, ПEEK)

4.5. Фитинги¹ (соединительные муфты)

Все мелкие детали, которые необходимы для соединения различных частей ВЭЖХ системы, именуются фитингами. Обычно с их помощью соединяют капилляры с колонкой или блоками хроматографической системы. На рис. 4.4 показан один из возможных вариантов соединений, но наряду с ним используются и другие. Фитингами, как видно из рисунка, называют перемещающуюся по капилляру деталь. Здесь изображен винт. Их изготавливают из стали или пластмассы (Kel-F или кетональдегидного полимера).

У стальных фитингов ферулы обычно отделены. В некоторых моделях ферулы состоят даже из двух частей: тонкого кольца и конической удлиненной части. После завинчивания стальные ферулы намертво сдавливают капилляр, который несколько сжимается. Их невозможно вновь разъединить. Хотя стальные фитинги и можно использовать с тефлоновыми или ПЭЭК капиллярами, это не рекомендуется, так как пластмассу можно неосторожно сильно пережать. В любом случае для установки необходимы гаечные ключи.

Полимерные фитинги бывают раздельными или совмещенными с ферулами, т.е. когда винт и ферула составляют единое целое. Капилляры менее подвержены сжатию при использовании полимерных фитингов, поэтому их можно разъединять. Они рекомендованы для всех типов полимерных капилляров, но их также вполне можно использовать и со стальными трубками. Никаких инструментов для их установки не требуется, так как они затягиваются вручную².

Сборку следует производить согласно поставляемому с фитингами руководству. Следует избегать пережатия и неправильного завинчивания «не по резьбе» (что нередко случается). Лучше всего изначально слегка затянуть фитинг и проверять на устойчивость к давлению и герметичность. При необходимости немного подтянуть винт. Пережатие может повредить капилляр и все соединение в целом. У фитингов короткий период службы, их нельзя использовать многократно³. Резьбу и коническую часть следует тщательно оберегать от силикагелевых и других частиц.

Многочисленные производители поставляют разнообразные типы соединений. Не смешивайте фитинги разных производителей! У них часто различается конусность



Рис. 4.4. Соединения для повышенных давлений

¹ J. W. Batts, *All About Fittings*, Scivex, Upchurch Scientific Division, P.O. Box 1529, Oak Harbor, WA98277, USA; *LC GC North Am.*, **24**, 1078 (2006).

² Это относится только к фитингам типа «fingertype». — *Прим. пер.*

³ Современные фитинги используются многократно. Они выдерживают до нескольких сот циклов использования. — *Прим. пер.*



ферул и длина, на которую капилляр выходит за ферулу: от 0,17 дюйма = 4,32 мм (Rheodyne) до 0,08 дюйма = 2,03 мм (Valco). Обычно шаг резьбы измеряется в дюймах, а не метрически, и длина резьбы неодинакова у разных производителей. Если длина, на которую капилляр выходит за ферулу, будет меньше, чем требуется, в системе образуется дополнительный внеколоночный объем, если слишком большая, то повредится капилляр или фильтр у колонки продавится в слой сорбента.

Отметим, что обозначение 1/16 на фитинге означает, что он подходит к капиллярам с таким внешним диаметром. Ширина головки винта может составлять 5/16 или около того.

4.6. Инжекторы для введения пробы

Ввод образца — это один из ключевых моментов в ВЭЖХ. Даже на самых лучших колонках получится плохое разделение, если нанесение осуществляется небрежно. Теоретически желательно наносить бесконечно малый объем раствора образца в центр начала колонки, предотвращая при этом попадание воздуха.

Существуют разные способы нанесения образца на колонку:

- а) шприцем через мембранный инжектор;
- б) через петлю инжектора;
- в) через автоматическую систему ввода образца (автосамплер).

Несмотря на то что нанесение на колонку через мембрану является наиболее прямым и приводящим к наименьшему размыванию пика, оно непригодно для ВЭЖХ. Его можно применять только при давлениях ниже 100 бар. Всегда существует опасность закупоривания иглы частицами мембраны. Более того, мембрана должна быть химически устойчива к различным растворителям, используемым в хроматографии.

На рис. 4.5 наглядно изображено, как работает *петля крана-инжектора*¹. Петля заполняется раствором образца, и затем уплотнение ротора с внутренними канавками поворачивается так, чтобы в поток элюента попало содержимое петли. Такие краны-инжекторы бывают шестипортовые, так как содержат шесть соединительных входов.

Петлю можно использовать двумя способами.

а) *Полное заполнение*. По мере заполнения петли образец не может полностью вытеснить находящийся в ней растворитель подобно поршню, а имеет обыкновение смешиваться с ним. Поэтому при количественном анализе с внешним стандартом петля должна заполняться, как минимум, пятью объемами раствора образца (например, 100 мкл раствора для петли в 20 мкл), так, чтобы в ней оставалось не более 1% остаточного растворителя (объем образца, очевидно, можно уменьшить при анализе с внутренним стандартом).

б) *Частичное заполнение*. Когда важно не потерять образец, петлю следует заполнять только наполовину, согласно инструкциям производителей. Потери в этом случае будут из-за частичного смешивания раствора образца

¹ J.W. Dolan, *LC Mag.*, 3, 1050 (1985).

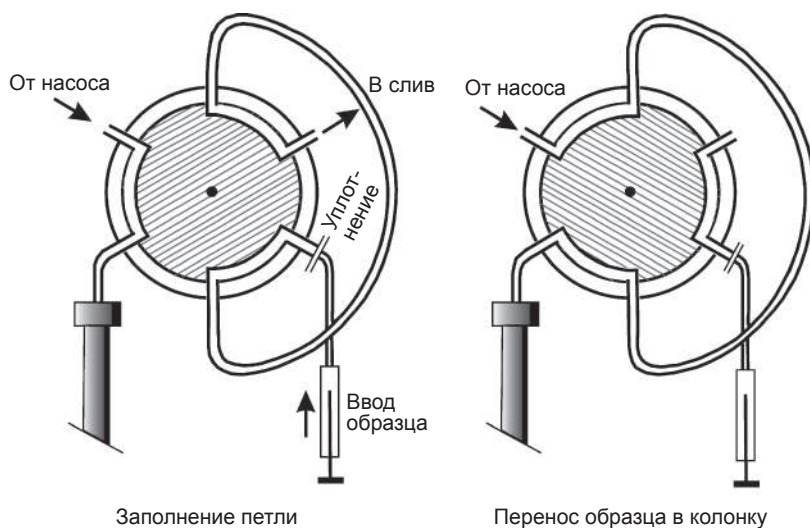


Рис. 4.5. Петля крана-инжектора. Заштрихованная область является уплотнением ротора

с жидкостью, которая уже находится в петле. Причиной тому — параболический профиль потока в капилляре. Для предотвращения этого можно попытаться вводить образец с «начальным пузырьком» — небольшим пузырьком воздуха перед наносимым раствором¹. В любом случае подвижная фаза должна течь по петле в противоположном введению образца направлению, как показано на рис. 4.5. При таком способе нанесения любое размывание зоны образца во время переноса на колонку будет подавляться, даже если образец заполняет лишь малую часть объема петли.

Выпускаются петли объемом от 5 до 2000 мкл². Они легко подсоединяются к инжектору и быстро заменяются. Меньшие количества образца, которые требуются для 3-мкм сорбентов и микроколонок, лучше всего наносить с помощью специального инжектора с внутренней петлей объемом от 0,5 до 5 мкл.

Вращающееся уплотнение инжектора делают обычно из полимера *vespel*, который обладает наилучшими механическими свойствами и может использоваться при pH от 0 до 10. Если у подвижной фазы pH еще выше, необходимо применять уплотнение из *tefzel*, устойчивого к высоким pH вплоть до 14. Но этот полимер менее устойчив к высокому давлению, и его каналы сужаются при таких условиях. Поверхность уплотнения *Tefzel* менее гладкая, чем поверхность *vespel*, поэтому использовать уплотнения для ротора из *tefzel* рекомендуется только в случае необходимости.

¹ М. С. Harvey and S. D. Stearns, *J. Chromatogr. Sci.*, **20**, 487 (1982).

² В настоящий момент выпускаются петли и большего объема для препаративной хроматографии. В частности, есть петли производства Knauer и Rheodyne на 10 и 20 мл. Существуют петли объемом до 50 мл, но они рассчитаны на хроматографию низких и средних давлений. — *Прим. пер.*

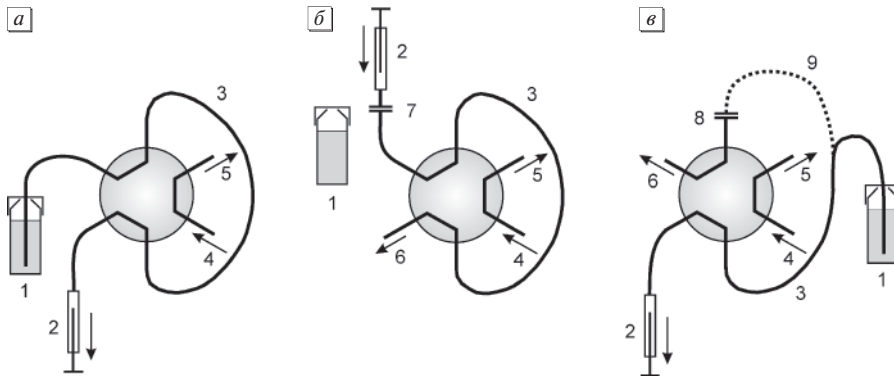


Рис. 4.6. Заполнение петли тремя разными способами с помощью автосамплера: а) всасывание в петлю; б) выдавливание в петлю; в) смешанный способ. 1 — виала с образцом, 2 — шприц с шаговым приводом поршня, 3 — петля, 4 — из насоса, 5 — к колонке, 6 — в слив, 7 — уплотнение для низкого давления, 8 — уплотнение для высокого давления, 9 — положение передвигной петли при переключении крана и перемещении образца в колонку

Сердцем автосамплера¹ является шестипортовый кран. Его петлю можно заполнять частично или полностью, как при ручном вводе. Между нанесениями образцов необходимы операции промывки, но они выполняются автоматически. Различные жидкости (образец, подвижная фаза, промывочный растворитель) могут быть отделены друг от друга аспирацией пузырьками воздуха. Используются разные принципы и варианты работы автосамплера.

а) *Нанесение всасыванием в петлю* (рис. 4.6а). Образец всасывается из виалы через петлю шприцем с шаговым приводом. Если нужно проанализировать серию образцов, то необходимо передвинуть в позицию 1 либо образец, либо шприц. Такая конструкция технически проста, но требует дополнительного объема образца, заполняющего капилляр между виалой и петлей, который затем отбрасывается и теряется. Метод заполнения жидкости подвержен кавитации, т.е. образованию пузырьков из-за понижения давления, и, следовательно, может приводить к неточности.

б) *Нанесение выдавливанием в петлю* (рис. 4.6б). Такая конструкция имитирует ручной ввод, так как образец засасывается в шприц и затем выталкивается в петлю через соединение (снабженное уплотнением низкого давления) иглы шприца с капилляром петли. Шприц также нужно передвигать и, возможно, также и виалы в зависимости от устройства автосамплера. Это гибкий способ по отношению к объему нанесения. При этом не требуется большого дополнительного объема образца.

в) *Совмещенное нанесение* (рис. 4.6в). Образец с помощью шприца (или насоса) отбирается из виалы в капилляр петли и после этого игла автосамплера перемещается в порт, снабженный уплотнением высокого давления. После этого кран переключается таким образом, чтобы насосом было возможно переместить образец в колонку. Образец не теряется и почти не возникает проблемы

¹ J.W. Dolan, *LC GC Eur.*, **14**, 276 (2001) или *LC GC North Am.*, **19**, 386 (2001).

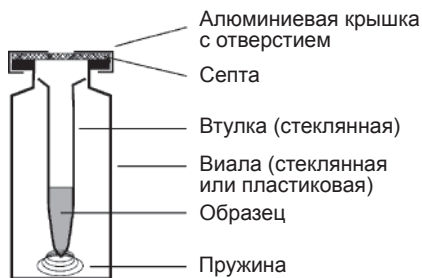


Рис. 4.7. Подпружиненная виала с конической вставкой для небольших объемов образца

переноса образца из предыдущего нанесения (см. ниже). Слабым местом такой конструкции может быть уплотнение высокого давления.

Автосамплер не может извлечь весь раствор образца до капли, так как игла должна быть на некотором расстоянии от дна виалы. Выходом из этой ситуации может быть использование виал с коническим дном или с конической вставкой на небольшой пружинке внутри виалы (рис. 4.7).

Инжектор вносит свой вклад в объем задержки системы ВЭЖХ (см. раздел 4.3). Следует помнить об этом при замене петли одного объема на значительно больший, например с объема 50 мкл на объем 1 мл. При сложном разделении, возможно, потребуется изменить профиль градиента.

В качестве промывочного растворителя используют обычно подвижную фазу без буферных солей. Она должна обладать хорошими растворяющими свойствами, чтобы удалить следы образцов из иглы и капилляров.

Важными характеристиками инъекционных систем хроматографов является их точность и перенос образца из предыдущего нанесения¹ (появление на хроматограмме следов от предыдущего образца). Их определяют в соответствии с общепринятой практикой, описанной в разделе 25.6. Точность должна быть не ниже 0,3 % относительного стандартного отклонения. Перенос образца должен составлять менее 0,05 %. Таких значений можно добиться только при надлежащем уходе, когда уплотнения ротора и игла регулярно заменяются. К тому же нужно, чтобы образец хорошо растворялся и не имел склонности адсорбироваться на уплотнениях или внутренней поверхности капилляров.

4.7. Раствор образца и его объем

Иногда *приготовление образца* вызывает затруднения, особенно в клинической химии или в химии окружающей среды². Основными операциями являются фильтрация (возможно, через специальные мембраны, которые селективно

¹ J. W. Dolan, *LC GC Eur.*, **19**, 522 (2006) или *LC GC North Am.*, **24**, 754 (2006).

² *Guide to Sample Preparation*, приложение к *LC GC Mag.* (1998), или *LC GC Eur.* (2000), Advanstar Communications; S. C. Moldoveanu and V. David, *Sample Preparation in Chromatography*, Elsevier, Amsterdam (2002); S. C. Moldoveanu, *J. Chromatogr. Sci.*, **42**, 1 (2004); Y. Chen et al., *J. Chromatogr. A*, **1184**, 191 (2008).

удерживают вещества), твердофазная экстракция через одноразовые картриджи¹ (также со специфической селективностью), осаждение белков и обессоливание. Особым случаем является пробоподготовка при анализе биополимеров.

При необходимости *раствор образца* следует отфильтровать, чтобы удалить твердые частицы. По возможности, лучше всегда растворять образец в подвижной фазе (плохая растворимость в подвижной фазе может привести к уширению заднего фронта пиков и закупориванию колонки, в этом случае следует заменить элюент). Если во время проскока есть сигнал из-за изменения показателя преломления, то растворитель образца должен быть слабее, чем подвижная фаза, но как можно ближе к нему по химическому составу. Например, пентан при элюции гексаном (на прямой фазе) или вода при элюции смесью метанола с водой (обращенная фаза). Число теоретических тарелок колонки может даже повыситься, если образец вводить в намного более слабом растворителе, чем подвижная фаза, так как при этом вещества концентрируются на входе в колонку². Если растворитель образца будет значительно сильнее подвижной фазы, это может привести к заметному размыванию пика, даже к образованию весьма странных профилей³. Это показано на рис. 4.8 при разделении на обращенной фазе. Подвижная фаза в данном случае содержит только 8 % ацетонитрила. Если в растворе образца ацетонитрила больше, чем в элюенте (что на обращенной фазе означает большую элюирующую силу), то в начале разделения полоса вещества размывается, а далее, по мере увеличения концентрации ацетонитрила в образце, довольно сильно искажается профиль пика.

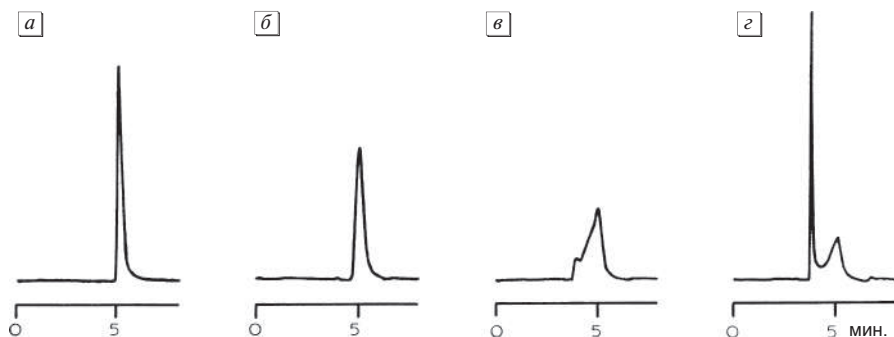


Рис. 4.8. Влияние растворителя образца на профиль пика (печатается с разрешения N. E. Hoffmann, S. L. Pan and A. M. Rustum, *J. Chromatogr.*, **465**, 189, 1989). Условия: образец — фенилаланин; подвижная фаза — буфер pH 3,5: ацетонитрил (92:8); сорбент — обращенная фаза; УФ, 210 нм. Образец растворяли в буфере с: а) 0 %; б) 30 %; в) 50 %; г) 70 % ацетонитрила

¹ M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, **856**, 3 (1999); C. R. Poole, *Trends Anal. Chem.*, **22**, 362 (2003).

² См. рис. 8 и 9 в P. J. Naish, D. P. Goulder and C. V. Perkins, *Chromatographia*, **20**, 335 (1985).

³ S. Keunckarian et al., *J. Chromatogr. A*, **1119**, 20 (2006). Исключение: E. Loeser, S. Babiak and P. Drumm, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 3409 (2009).

О количестве образца, которое можно нанести на колонку, уже говорилось в разделе 2.7. Что же касается требуемого для растворения объема, то он может меняться. С одной стороны, он должен быть как можно меньшим, чтобы не увеличивать неизбежное уширение полосы. С другой стороны, желательнее растворять образец в относительно большом объеме, чтобы предотвратить перегрузку по массе на входе в колонку. Безусловно, существует верхний предел наносимого объема (который намеренно превышают при препаративном разделении). Объем пика на выходе из колонки в конечном счете больше, чем объем на входе (раздел 19.2). Следовательно, наносимый объем должен быть меньше, чем степень уширения полосы, происходящей в колонке (измеряется как объем элюирования), чтобы избежать значительного снижения числа теоретических тарелок.

ГЛАВА 5

СВОЙСТВА РАСТВОРИТЕЛЕЙ

5.1. Таблица органических растворителей

В табл. 5.1 собрано большое количество растворителей в порядке возрастания их полярности. Многие из них не пригодны для использования в качестве подвижных фаз по причинам, которые обсуждаются в разделе 4.1. Из таблицы становится ясно, почему некоторые растворители не стоит использовать из-за того, к примеру, что у них либо УФ-поглощение, либо вязкость слишком велики. Некоторые растворители используются в качестве добавок в низких концентрациях в определенных случаях: небольшое количество амина делает подвижную фазу основной, кислота сообщает элюенту кислые свойства.

В таблице собраны следующие свойства растворителей.

Элюирующая сила (ϵ°): это параметр, определяющий элюирующую силу растворителя при его использовании в качестве мобильной фазы на силикагельных колонках. Он представляет собой энергию адсорбции молекулы, отнесенную к единице площади адсорбента. Список растворителей, составленный с учетом их элюотропной силы, называется *элюотропным рядом*. [Во многих таблицах величины ϵ° представлены по отношению к окиси алюминия, которые имеют более высокие значения $\epsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3) = 1,3 \epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$.]

Вязкость (η): дана в мПа·с при температуре 20 °С. Растворители с более высокой, чем у воды ($\eta = 1,0$), вязкостью менее пригодны для ВЭЖХ, поскольку они дают слишком большое повышение давления.

Показатель преломления: согласно аббревиатуре n_D^{20} приведены значения при температуре 20 °С.

Предел УФ прозрачности: это длина волны, при которой поглощение чистого растворителя, измеренное в сантиметровой кювете и в сравнении с пустой кюветой (10 % пропускания), равно единице. Величины, приведенные в таблице, справедливы только для высокочистых растворителей. У менее очищенных растворителей предел прозрачности выше.

Температура кипения: слишком низкокипящие растворители менее удобны. Пузырьки пара растворителей опасны для ВЭЖХ-систем. Дегазирование может приводить к потере растворителя.

Дипольный момент (μ^):* это мера способности растворителя взаимодействовать с растворенным веществом благодаря дипольным и поляризационным силам.

Таблица 5.1. Элюотропный ряд и свойства растворителей

Растворитель	Элюирующая сила, ϵ°	Вязкость η , мПа·с	Показатель преломления, n_D^{20}	Предел УФ прозрачности, нм	Температура кипения, $^\circ\text{C}$	Дипольный момент, Д^*	Кислотность, α	Основность, β
Фторалкан FC-78	-0,19	0,4	1,267	210	50			
<i>n</i> -Пентан	0,00	0,23	1,3575	195	36			
<i>n</i> -Гексан	0,00	0,33	1,3749	190	69			
Изооктан	0,01	0,50	1,3914	200	99			
Циклогексан ^a	0,03	1,00	1,4262	200	81			
Циклопентан	0,04	0,47	1,4064	200	49			
Тетрахлорметан	0,14	0,97	1,4652	265	77			
<i>n</i> -Ксилол	0,20	0,62	1,4958	290	138	0,81	0,00	0,19
Диизопропиловый эфир	0,22	0,37	1,3681	220	68	0,36	0,00	0,64
Толуол	0,22	0,59	1,4969	285	111	0,83	0,00	0,17
Хлорбензол	0,23	0,80	1,5248	290	132	0,91	0,00	0,09
Бензол	0,25	0,65	1,5011	280	80	0,86	0,00	0,14
Диэтиловый эфир	0,29	0,24	1,3524	205	34,5	0,36	0,00	0,64
Хлористый метилен (дихлорметан)	0,30	0,44	1,4242	230	40	0,73	0,27	0,00
Хлороформ	0,31	0,57	1,4457	245	61	0,57	0,43	0,00
1,2-Дихлорэтан	0,38	0,79	1,4448	230	83	1,00	0,00	0,00
Триэтиламин	0,42	0,38	1,4010	230	89	0,16	0,00	0,84
Ацетон ^b	0,43	0,32	1,3587	330	56	0,56	0,06	0,38

Таблица 5.1. (Окончание)

Растворитель	Элюирующая сила, ϵ°	Вязкость η , мПа·с	Показатель преломления, n_D^{20}	Предел УФ прозрачности, нм	Температура кипения, $^\circ\text{C}$	Дипольный момент, Д^*	Кислотность, α	Основность, β
Диоксан	0,43	1,54	1,4224	220	101	0,60	0,00	0,40
Метилацетат	0,46	0,37	1,3614	260	56	0,55	0,05	0,40
Тетрагидрофуран	0,48	0,46	1,4072	220	66	0,51	0,00	0,9
<i>трет</i> -Бутилметилловый эфир	0,48	0,35	1,3689	220	53	0,36	0,00	0,64
Этилацетат	0,48	0,45	1,3724	260	77	0,55	0,00	0,45
Диметилсульфоксид	0,48	2,24	1,4783	270	189	0,57	0,00	0,43
Нитрометан	0,49	0,67	1,3819	380	101	0,64	0,17	0,19
Ацетонитрил	0,50	0,37	1,3441	190	82	0,60	0,15	0,25
Пиридин	0,55	0,94	1,5102	305	115	0,58	0,00	0,42
Изопропанол	0,60	2,3	1,3772	210	82	0,22	0,35	0,43
Этанол	0,68	1,20	1,3614	210	78	0,25	0,39	0,36
Метанол	0,73	0,60	1,3284	205	65	0,28	0,43	0,29
Уксусная кислота	Высокая	1,26	1,3719	260	118	0,31	0,54	0,15
Вода	Еще выше	1	1,3330	<190	100	0,39	0,43	0,18
Растворы солей, буферы	Наивысшая							

^a Зависит от температуры. Циклогексан становится твердым при давлении >300 бар. В. Е. Lendi and V. R. Meyer, *LC GC Eur.*, **19**, 476 (2006).

^b Достаточно разбавленный, ацетон имеет «УФ-окно» при 210 нм. При этой длине волны смесь вода/ацетон (9:1) показывает поглощение приблизительно 0,4.

Кислотность (α): это мера способности растворителя выступать в качестве донора протонов по отношению к основанию (акцептору), которым является растворенное вещество.

Основность (β): это мера способности растворителя взаимодействовать с донором протонов по отношению к растворенному веществу с кислыми свойствами (донору).

Важно: π^* , α и β нормализованы таким образом, что их сумма дает единицу, и, поэтому это лишь относительные величины. Это так называемые *сольватохромные параметры*¹, которые могут быть использованы для характеристики селективности растворителя (см. раздел 5.2). Растворители с низкой полярностью от фторалканов до четыреххлористого углерода не взаимодействуют с растворенными веществами посредством водородных связей или дипольных моментов, и, таким образом, никаких сольватохромных параметров для них не приводится.

5.2. Селективность растворителя

Самым эффективным средством воздействия на разделение является изменение селективности фазовой системы. Это может быть сделано, если использовать другой метод разделения (например, замена нормальнофазовой хроматографии



Рис. 5.1. Треугольник селективности

¹ L. R. Snyder, P. W. Carr and S. C. Rutan, *J. Chromatogr. A*, **656**, 537 (1993).



на обращенно-фазовую) или другую стационарную (например, октадецил вместо фенильной фазы) или подвижную фазу. В последнем случае лучше всего выбрать растворители с большими различиями в селективности (см. табл. 5.1), которая характеризуется сольватохромными параметрами.

Если эти параметры используются для построения диаграммы, показанной на рис. 5.1, то полученный треугольник селективности ясно покажет разницу между индивидуальными растворителями с учетом их дипольных моментов (π^*), кислотности (α) и основности (β)¹. Наибольшие различия в порядке элюирования можно ожидать тогда, когда растворители выбираются как можно дальше друг от друга. Следует выбирать только те растворители, которые смешиваются друг с другом. В большинстве случаев это смесь двух растворителей А и Б. Обычно для нормальнофазовой хроматографии растворитель А — гексан, а для обращенно-фазовой — вода. Следовательно, число возможных растворителей Б ограничено. Если вам нужна селективность, то нет никакого смысла использовать диэтиловый эфир вместо *трет*-бутилметилового эфира в условиях нормальнофазовой хроматографии, так как все простые алифатические эфиры расположены в том же месте треугольника селективности. Точно так же не стоит пытаться изменить селективность при замене одного алифатического спирта на другой в обращенно-фазовых separations.

Бензол и его производные используют редко, поскольку они не позволяют применять УФ-детектирование.

5.3. Смешиваемость

На рис. 5.2 дан обзор смешиваемости растворителей (при комнатной температуре) в обычной ВЭЖХ. Смешиваемость зависит от температуры. Более того, в определенных пропорциях многие растворители частично растворимы друг в друге. Эти случаи не представлены на рисунке, поскольку всегда лучше брать такие растворители, которые смешиваются в интервале от чистого А до чистого Б.

Ацетон, ледяная уксусная кислота, диоксан, абсолютированный этанол, изопропанол и тетрагидрофуран являются теми растворителям, которые полностью смешиваются с другими (от гексана до воды).

5.4. Буферы²

Буферы необходимы в ионообменной и зачастую в обращенно-фазовой хроматографии. Если нужно разделить ионные или ионизирующиеся соединения, то часто, хотя и не всегда, необходимо провести разделение при строго

¹ См. сноску 1, стр. 90.

² R.J. Beynon and J.S. Easterby, *Buffer Solutions — The Basics*, IRL Press, Oxford (1996); J.W. Dolan, *A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection*, Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, свободный доступ на www.ace-hplc.com.

	Ксилол	Вода	Толуол	ТГФ	Пентан	Метанол	Изопропанол	Изооктан	Гексан	Этанол	Этилацетат	Диоксан	ДМСО	Диизопропил. эфир	Диэтиловый эфир	Дихлорметан	1,2-Дихлорэтан	Циклопентан	Циклогексан	Хлороформ	Тетрахлорметан	т-Бутилметил. эфир	Бензол	Ацетонитрил	Ацетон	Уксусная кислота
Уксусная кислота																										
Ацетон																										
Ацетонитрил																										
Бензол																										
т-Бутилметил. эфир																										
Тетрахлорметан																										
Хлороформ																										
Циклогексан																										
Циклопентан																										
1,2-Дихлорэтан																										
Дихлорметан																										
Диэтиловый эфир																										
Диизопропил. эфир																										
ДМСО																										
Диоксан																										
Этилацетат																										
Этанол																										
Гексан																										
Изооктан																										
Изопропанол																										
Метанол																										
Пентан																										
ТГФ																										
Толуол																										
Вода																										
Ксилол																										

Рис. 5.2. Смешиваемость растворителей. Несмешиваемые пары окрашены в серый цвет

определенном pH. Анализируемые вещества с помощью буфера можно привести как в недиссоциированную, так и в ионизированную форму в зависимости от типа разделения. Выбранное значение pH буфера должно отстоять на две единицы от pK_a интересующих соединений, для того чтобы большинство молекул находилось в одинаковой форме.

Кислые анализируемые вещества: буфер с pH на две единицы ниже pK_a дает недиссоциированные формы. Буфер с pH на две единицы выше pK_a дает ионизированные формы (анионы).

Основные анализируемые вещества: буфер с pH на две единицы выше pK_a дает недиссоциированные формы. Буфер с pH на две единицы ниже pK_a дает ионизированные формы (катионы).

Что касается ионной силы буфера, то лучше всего начать с 25 мМ раствора. Слишком малая ионная сила не даст нужного эффекта, так как емкость буфера будет мала.

Таблица 5.2. Величины pK_a для наиболее общеупотребительных буферов

Ион	pK_a
Ацетат	4,8
Аммоний	9,2
Борат	9,2
Цитрат	3,1, 4,7, 5,4
Диэтиламмоний	10,5
Формиат	3,7
Глицин	2,3, 9,8
1-Метилпиперидиний	10,3
Перхлорат	–9,0
Фосфат	2,1, 7,2, 12,3
Пирролидиний	11,3
Триэтиламмоний	10,7
Трифтоацетат ^а	0,2
Трис ^б	8,3

^а ТФУ (трифторацетат-ион) — общеупотребительная летучая добавка в буфер для разделения белков и пептидов. В зависимости от качества и партии может давать разные пики-призраки. Общие свойства ТФУК: Y. Chen *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **1043**, 9 (2004).

^б Трис-(гидроксиметил)аминометан.

Буферы с высокой ионной силой (например, 100 мМ) сложно использовать в сочетании с органическими растворителями¹. Рекомендуется для выбранных буферов проверять общую смешиваемость с органическими растворителями во всем диапазоне соотношений. Буферные растворы необходимо фильтровать *после* приготовления! В них охотно заводятся бактерии, и поэтому целесообразно добавлять в них 0,1 % азида натрия. Буферный раствор не должен оставаться в хроматографической системе, если работа закончена. Он должен быть замещен водой и в дальнейшем, в случае обращенно-фазовых колонок, чистым органическим растворителем. Если это процедура займет слишком много времени, то необходимо оставить насос работающим с низкой скоростью потока.

Буферные растворы эффективны в интервале ± 1 pH от их pK_a . В табл. 5.2 даны некоторые распространенные буферные ионы и соответствующие величины pK_a .

Величину pH буферного раствора можно определить непосредственно в водном растворе или вычислить, исходя из количества соли и кислоты или соли и основания соответственно. Если в системе присутствует еще и органический растворитель, то ионное взаимодействие будет более сложными, и pH изменится. Однако нет необходимости рассматривать такие эффекты. Во время

¹ A. P. Shellinger and P. W. Carr, *LC GC North Am.*, **22**, 544 (2004).

Таблица 5.3. Летучие буферные системы*

pH	Состав	Противоион
2,0,	Муравьиная кислота	H ⁺
2,3—3,5	Пиридин/муравьиная кислота	HCOO ⁻
3,0—6,0	Пиридин/уксусная кислота	CH ₃ COO ⁻
6,8—8,8	Триметиламин/HCl	Cl ⁻
7,0—12,0	Триметиламин/CO ₂	CO ₃ ⁻
7,9	Бикарбонат аммония	HCO ₃ ⁻
8,0—9,5	Карбонат аммония/аммиак	CO ₃ ⁻
8,5—10,0	Аммиак/уксусная кислота	CH ₃ COO ⁻
8,5—10,5	Этаноламин/HCl	Cl ⁻

* Печатается с разрешения D. Patel, *Liquid Chromatography Essential Data*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 1997, p. 89.

приготовления подвижной фазы необходимо заранее довести pH еще водного раствора до нужного значения и только потом добавить органический растворитель. Результирующее значение pH потом не измеряют.

Буферные растворы часто готовят из коммерчески доступного концентрата; если разбавление делают правильно, то получится желаемое значение pH, которое потом нет необходимости проверять. Если купить концентрат по какой-либо причине невозможно, то лучше всего взять навески необходимых реагентов (количества которых можно высчитать или найти по таблицам) и разбавить до нужного объема¹.

Летучие буферы нужны, если вы используете масс-детектор, детектор по светорассеянию или препаративную хроматографию. Такие буферы представлены в табл. 5.3. Летучесть кислот, оснований и их солей была исследована Petritis и др.² Добавки в буферы при использовании ИЭР-МС (ионизация электрораспылением с масс-спектрометрией) были опубликованы в работе García³.

5.5. Срок годности элюентов

На практике хорошо, когда готовится ровно столько подвижной фазы, сколько можно использовать в короткий промежуток времени. Сроки годности водных растворов без добавок органических растворителей, если должны быть соблюдены строгие стандарты качества, очень ограничены⁴.

¹ G. W. Tindall and J. W. Dolan, *LC GC Eur.*, **16**, 64 (2003) или *LC GC North Am.*, **21**, 28 (2003).

² K. Petritis et al., *LC GC Eur.*, **15**, 98 (2002).

³ M. C. García, *J. Chromatogr. B*, **825**, 111 (2005).

⁴ B. Renger, Byk Gulden, Konstanz, Germany, личное сообщение, 1998.

Предварительно очищенная вода	3 дня
Водные растворы (без буферов)	3 дня
Буферные растворы	3 дня
Водные растворы с содержанием органических растворителей <15 %	1 месяц
Водные растворы с содержанием органических растворителей >15 %	3 месяца
Органические растворители	3 месяца

5.6. Калькулятор смесей элюентов

Калькулятор смешивания является удобным средством для расчета смесей растворителей. На рис. 5.3 показано, как им пользоваться. Берем, в общем случае, три смеси: исходную смесь, смесь, которую нужно добавить к исходной, чтобы получить желаемую, и, собственно, желаемую конечную смесь. В частном случае смесь, которую нужно добавить к исходной, может представлять собой чистый растворитель. Концентрация c (обычно в объемных процентах) конкретного растворителя обозначена как разница между концентрацией исходной и конечной смесей. Таким образом, весь процесс расчета можно представить в виде креста, в центре которого находится смесь, которую нужно получить. Знак «минус», получаемый в одном из двух вычислений, не принимаем во внимание. Полученные в результате вычитания величины представляют собой объемы, которые нужно смешать, чтобы в конечном итоге получить смесь нужного состава.

Задача 17

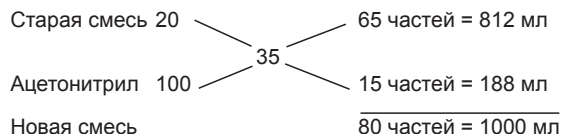
Необходимо приготовить смесь вода/ацетонитрил 65:35. Имеется некоторое количество смеси 80:20.

Решение

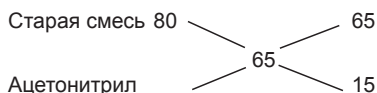
В смеси 1 20 % ацетонитрила. Необходимо добавить чистый ацетонитрил, т.е. $c_2 = 100\%$.

$$\begin{array}{rcl}
 c_1 & \nearrow & |c_2 - c_m| = a \text{ (мл)} \\
 & c_m & \\
 c_2 & \searrow & |c_1 - c_m| = b \text{ (мл)} \\
 \hline
 \text{сумма} & & = m \text{ (мл)}
 \end{array}$$

Рис. 5.3. Калькулятор смесей элюентов. c_1 — содержание (%) в смеси, или растворитель 1, c_2 — содержание (%) в смеси, или растворитель 2, c_m — содержание в новой смеси, a, b, m — объемы смесей, или растворителей, где $m = a + b$



Объем частей — 65 частей смеси 1 и 15 частей растворителя 2, дающих 80 частей, которые должны составлять в сумме 1000 мл. Таким образом, 65 частей соответствуют 812 мл и 15 частей — 188 мл. (Проверка результата проста: $812 \text{ мл} \times 0,2 = 162 \text{ мл}$, плюс 188 мл = 350 мл ацетонитрила в 1 л получившейся смеси.) Задача может быть решена и по-другому, исходя из содержания воды:



Другие примеры практических задач:

- а) 600 мл смеси гексан/ТГФ 60:40 необходимо разбавить до соотношения 85:15. Решение: добавьте 1 л гексана.
- б) Приготовить 1,5 л смеси вода/ацетонитрил 50:50 из смесей вода/ацетонитрил 90:10 и 30:70. Решение: смешайте 0,5 л смеси 90:10 и 1 л смеси 30:70.
- в) Нужна смесь вода/диоксан 70:30, при том что в наличии имеется 800 мл смеси 45:55. Решение: добавьте 667 мл воды.

Помните, что в старых смесях на самом деле может и не быть исходного количества растворителей 1 и 2 и, таким образом, состав новой смеси может отличаться от той, что нужна. Из-за эффекта объемного сжатия нельзя готовить смеси метанол/вода в мерной колбе, доводя объем до метки.

Калькулятор не работает для буферных смесей, когда необходимо получить новый буфер с определенным значением pH!

ГЛАВА 6

ДЕТЕКТОРЫ

6.1. Общие положения

Детектор должен распознавать вещество в момент его элюирования с колонки, т.е. контролировать изменение в составе подвижной фазы каким-либо способом, преобразовывать его в электрический сигнал и передавать на монитор, где он появляется в виде отклонений от базовой линии. В идеале детектор должен:

- а) быть одинаково чувствительным ко всем элюируемым пикам либо регистрировать только интересные;
- б) не зависеть от колебаний температуры или изменений состава подвижной фазы (как, например, при градиентной элюции);
- в) регистрировать малые количества вещества (анализ следовых количеств);
- г) не вносить вклад в уширение пика, т.е. иметь малый объем ячейки;
- д) обладать мгновенным откликом, чтобы точно считывать узкие пики веществ, быстро проходящих через ячейку;
- е) легко управляться, быть устойчивым и недорогим.

Перечисленные требования являются утопичными и некоторые из них взаимоисключающи. Поэтому детекторы лучше оценивать по параметрам, которые обсуждаются ниже.

Чувствительность к концентрации или к массе

Детекторы, чувствительные к концентрации, выдают сигнал S , пропорциональный концентрации c образца в элюате:

$$S \propto c(\text{г} \cdot \text{мл}^{-1}).$$

У детекторов, чувствительных к массе, сигнал пропорционален потоку массы, т.е. числу n молекул или ионов образца в элюате за единицу времени, Δt .

$$S \propto n/\Delta t(\text{г} \cdot \text{с}^{-1}).$$

Тип используемого детектора можно определить следующим способом — выключить насос на максимуме пика: у чувствительных к концентрации детекторов текущее значение остается на прежнем уровне, а у масс-чувствительных детекторов падает.

Все рассматриваемые в разделах 6.2—6.7 детекторы являются чувствительными к концентрации, за исключением электрохимических, детекторов по светорассеянию и фотопроводимости, которые чувствительны к массе.

Селективность

Неселективные детекторы реагируют на общие свойства раствора. Рефрактометрические детекторы контролируют показатель преломления элюата. Чистая подвижная фаза обладает собственным коэффициентом преломления, который меняется при элюции любого соединения. Детектор откликается на эту разницу и регистрирует все пики. Отсюда и термин: неселективный детектор, или детектор общих характеристик. Вот почему рефрактометрический детектор, также как и кондуктометрический, не подходят для градиентного разделения.

В противоположность этому УФ-детектор идентифицирует только те соединения, которые поглощают минимальное количество УФ-излучения определенных длин волн, и, следовательно, является селективным.

Шумы¹

Усиление сигнала детектора показывает, что базовая линия не является ровной, даже при отсутствии пиков. Высокочастотные (с малым периодом) шумы (рис. 6.1а) могут возникать из-за недостаточного заземления детектора и/или системы сбора данных. Небольшой уровень шумов, однако, остается, несмотря на удовлетворительное заземление и использование самого современного оборудования. Высокочастотные шумы накладываются на низкочастотные (с длинным периодом) шумы (рис. 6.1б).



Рис. 6.1. Высоко- (а) и низкочастотные (б) шумы

Основной причиной шумов во многих случаях является подвижная фаза (примеси, пузырьки газов, частички сорбента, изменения скорости потока), но могут играть роль и резкие колебания температуры окружающей среды (если детектор расположен на сквозняке). Помехи питания, такие как, например, импульсы переключателя термостата, тоже могут оказывать влияние. В этом случае рекомендуется использовать низкочастотные фильтры. Иногда помогают самодельные «клетки Фарадея» из алюминиевой фольги.

Предел обнаружения

Минимально детектируемый сигнал должен быть не меньше, чем двойная высота самого высокого пика шума, такого как, например, пик 5 нг пестицида дитианона на рис. 6.2. При меньших количествах сигнал сливается с шумом. Для качественного анализа соотношение сигнал/шум (S/N) должно быть не ниже 3—5, для количественного определения оно должно быть выше 10.

¹ J.W. Dolan, *LC GC Eur.*, **14**, 530 (2001) and **15**, 142 (2002) or *LC GC North Am.*, **19**, 688 (2001) and **20**, 114 (2002).

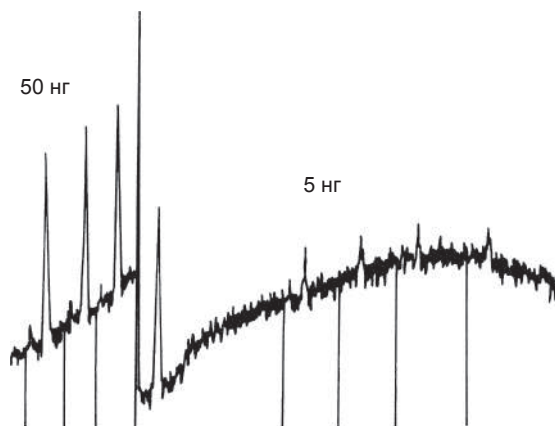


Рис. 6.2. Минимально детектируемый сигнал. Соотношение S/N составляет ≈ 10 у первых четырех разделений, у последующих ≈ 2 . Условия: колонка 500×3 мм, сорбент — Perisorb A, подвижная фаза — гептан/этилацетат (95:5), УФ, 254 нм. Воспроизведено с разрешения из: F. Eisenbeiss and H. Sieper, *J. Chromatogr.*, **83**, 439 (1973)

К таким утверждениям, как «детектор X может улавливать, по крайней мере, 1 нг бензола», следует относиться с осторожностью. На определение таких количеств могут влиять многие лимитирующие факторы. Более корректным для чувствительных к концентрации детекторов было бы утверждение, что предел обнаружения составляет 1 нг/мл.

Дрейф

Характеризует отклонение базовой линии и регистрируется в виде наклонной линии¹ (рис. 6.3).

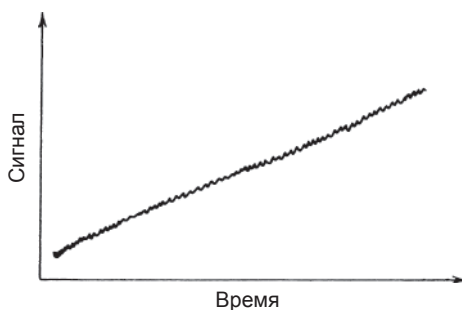


Рис. 6.3. Дрейф базовой линии

Дрейф — обычное явление при включении детектора. Но, как только электронная система и лампы достигнут своей рабочей температуры, базовая линия становится стабильной, если не возникает дрейф по одной из следующих причин:

¹ Дрейф может быть и не монотонным. — Прим. пер.

- а) градиентная элюция (изменяется показатель преломления подвижной фазы, который улавливается УФ-детектором);
- б) предыдущий элюент не полностью замещен новым после смены;
- в) изменения в составе подвижной фазы (испарение, чересчур интенсивная дегазация);
- г) изменение окружающей температуры.

Линейность

Идеальный детектор дает сигнал, площадь которого пропорциональна количеству вводимого вещества, независимо от того, большое оно (количество) или нет. Очевидно, что такая линейность не бесконечна, но должна охватывать как можно более широкий диапазон. Наклон линии, изображенной на рис. 6.4, называется *чувствительностью* и представляет собой меру, с какой детектор реагирует на специфические изменения концентрации.

Линейность у УФ-детекторов выше, чем у рефрактометрических. Их линейный диапазон составляет 1:10 000, т.е., к примеру, если верхний предел $5 \cdot 10^{-4}$ г/мл, то соответствующий нижний предел будет $5 \cdot 10^{-8}$ г/мл.

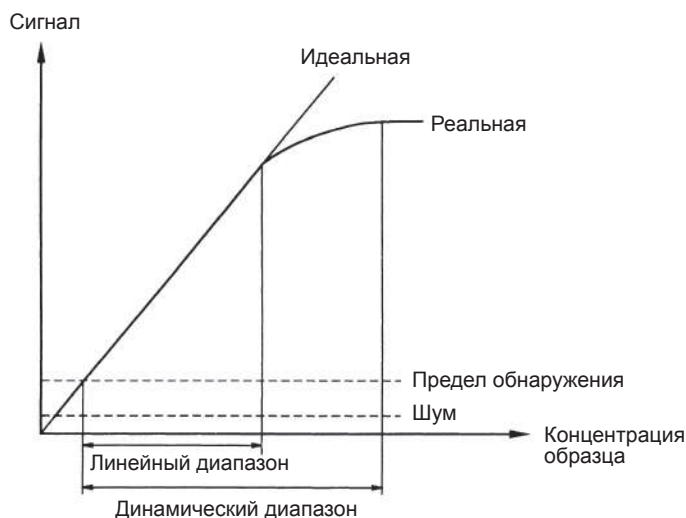


Рис. 6.4. Линейность детектора

Временная константа

Временная константа τ — это мера скорости регистрации пика детектором. Поскольку детектор работает с системой сбора данных, временная константа становится в этом случае важным фактором. Временную константу можно определить как минимальный промежуток времени, который требуется для системы, чтобы достичь 63 % полной шкалы значений ($1 - 1/e = 0,63$; устанавливают также и 98 % от полной шкалы). Она не должна быть больше 0,3 с при детектировании очень узких ВЭЖХ-пиков, т.е. тех пиков, которые элюируются быстро,

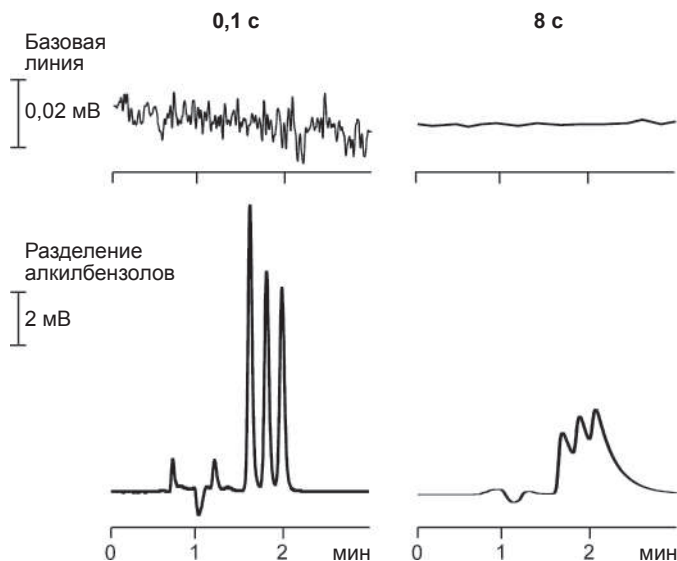


Рис. 6.5. Влияние временной константы (воспроизведено с разрешения D. Stauffer, Hoffmann-La Roche, Basel). Условия: образец — этил-, бутил- и *трет*-бутилбензолы; колонка — 125×4 мм; сорбент — LiChrospher RP-18, 5 мкм; подвижная фаза 1 мл/мин, вода/метанол (95:5); УФ, 250 нм

в объеме меньшем, чем 100 мкл, и не превышать 0,1 с для высокоскоростной ВЭЖХ. Чересчур малое значение временной константы повышает уровень шума, а при слишком большом ее значении пики начинают уширяться и размываться (рис. 6.5). У более совершенных детекторов есть возможность выбора значения временной константы.

Объем ячейки

Объем ячейки детектора должен незначительно влиять на размывание пика и поэтому составлять меньше 10% от объема элюции самого узкого (первого) пика. Стандартным является объем ячейки 8 мкл. Слишком малый объем ухудшает предел обнаружения (так как все же необходимо определенное количество анализируемого вещества, чтобы получить хоть какой-то сигнал). В микро-ВЭЖХ объем ячейки должен быть значительно меньше 8 мкл. У ячейки не должно быть мертвых зон, которые могут препятствовать полному вымыванию вещества элюентом.

После прохождения элюата через колонку давление в нем существенно падает. Поэтому в этот момент существует наибольший риск образования пузырьков, который невозможно полностью исключить, несмотря ни на какие меры предосторожности. По этой причине следует к выходу детектора подсоединять длинный стальной либо фторопластовый капилляр, чтобы ячейка всегда была под небольшим давлением (1–2 бара), при этом необходимо учесть предел устойчивости ячейки к давлению (то же самое относится к последовательно соединенным детекторам). Существуют УФ-детекторы с ячейками, которые

выдерживают давление до 150 бар. *Внимание:* если в подвижную фазу добавить небольшое количество более полярного соединения (например, 1 % этанола в гексан), то стекло ячейки может покрыться тонкой пленкой этого соединения. Элюирование относительно полярного вещества может смывать эту пленку, приводя при этом к появлению ложных пиков.

6.2. УФ-детекторы¹

Это самый распространенный тип используемых детекторов, так как он является довольно чувствительным, обладает линейностью в большом диапазоне, относительно не зависит от температурных колебаний, а также пригоден для градиентной элюции. Он регистрирует соединения, которые поглощают ультрафиолет или видимую область света. Поглощение при длине волны выше 200 нм происходит только в том случае, если молекула, по крайней мере, имеет:

- а) двойную связь, сопряженную с атомом с неподеленной электронной парой $X = Y - Z$ (например, виниловый эфир);
- б) атомы брома, йода или серы;
- в) карбонильную группу $C = O$; нитрогруппу NO_2 ;
- г) две сопряженные двойные связи $X = X - X = X$;
- д) ароматическое кольцо;
- е) неорганические ионы: Bg^- , I^- , NO_3^- , NO_2^- .

Эти группы поглощают с разной степенью интенсивности и на разных длинах волн. На интенсивность и значение длины волны максимального поглощения влияют соседние группы атомов. Молярный коэффициент поглощения ϵ , который для большинства соединений приводится в таблицах многих справочников, является мерой интенсивности поглощения света. Например, ароматические молекулы обладают большим, а кетоны (с функциональной группой $C = O$) сравнительно меньшим молярным коэффициентом поглощения.

Степень поглощения проходящего через ячейку луча света зависит от молярного коэффициента поглощения ϵ , молярной концентрации соединения c , длины ячейки d . Произведение ϵ , c и d есть не что иное, как оптическая плотность A :

$$A = \epsilon cd.$$

Величина A — это безразмерное число, и единицу оптической плотности обычно выражают через абсорбционную единицу (AU). Выражение «1 a.u.f.s.», или «1 единица оптической плотности на всю шкалу» (которое на сегодняшний день почти устарело), означает, что самописец регистрирует поглощение в 1 единицу при отклонении на полную шкалу.

УФ-детектор измеряет поглощение элюата. Подвижную фазу следует выбирать по оптической прозрачности при установленной нужной длине волны, т. е. чтобы ее (подвижной фазы) поглощение было около 0 или, по крайней мере, его можно было обнулить принудительно электронными средствами детектора.

¹ B. E. Lendi and V. R. Meyer, *LC GC Eur.*, **18**, 156 (2005). Про диодно-матричные детекторы см. раздел 6.10.

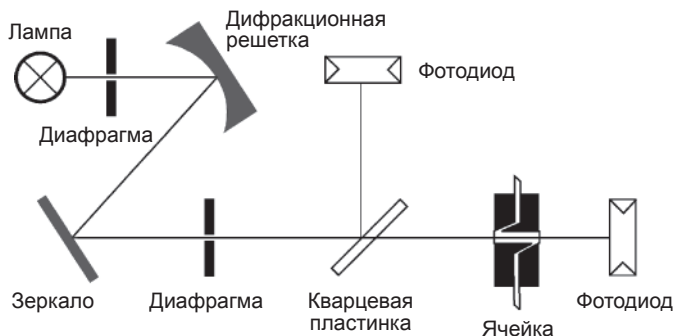


Рис. 6.6. Принципиальная схема УФ-детектора (упрощенная)

В этом случае сигнал самого детектора приравняется нулю, а параметры интегратора устанавливают в исходное положение и прописывается базовая линия¹. Согласно вышеприведенному уравнению высота пика зависит от молярного коэффициента поглощения и концентрации вещества, проходящего через ячейку детектора. У соединений с большим коэффициентом поглощения пики выше, чем у соединений с меньшим коэффициентом, при их одинаковых концентрациях.

Так как амплитуда сигнала зависит от длины светового пути, d , проточная ячейка в УФ-детекторах должна быть как можно длиннее. 10 мм в данном случае не есть что-то необычное. В то же время она должна быть минимального объема. Свет через ячейку проходит в продольном направлении. На рис. 6.6 показана одна из таких конструкций.

С помощью дифракционной решетки устанавливается заданная длина волны на оптическом пути. Напротив ячейки детектора установлена кварцевая пластинка, которая отражает небольшую часть света на фотодиод сравнения. Большая часть света проходит через пластинку и ячейку на измерительный фотодиод. Диод сравнения позволяет устранить минорные колебания интенсивности света, которые могут возникнуть. Ячейка детектора сконструирована таким образом, чтобы свести к минимуму шум и отклонения при любых изменениях показателей преломления или дрейфе базовой линии (который всегда присутствует в градиентной элюции).

Используется два типа ламп.

Дейтериевая лампа излучает непрерывный УФ спектр (до 340 нм, рассеянный свет до 600 нм). Длину волны, при которой обычно регистрируют пики, можно установить по максимуму поглощения исследуемого соединения, а также выбрать такую, которая позволит отсеять мешающие пики для повышения точности интегрирования или селективности. На рис. 6.7 сравнивается неселективное (регистрируются все пептиды) и селективное (регистрируются только пептиды с ароматическими аминокислотами) детектирование.

Вольфрамовая лампа излучает в области, близкой к УФ, и в видимой области (около 350—850 нм). Является отличным дополнением к дейтериевым лампам.

¹ Давно уже нет никаких интеграторов. Их можно было бы найти в музеях, если бы такие музеи создавали хроматографисты, вышедшие на пенсию. — *Прим. пер.*

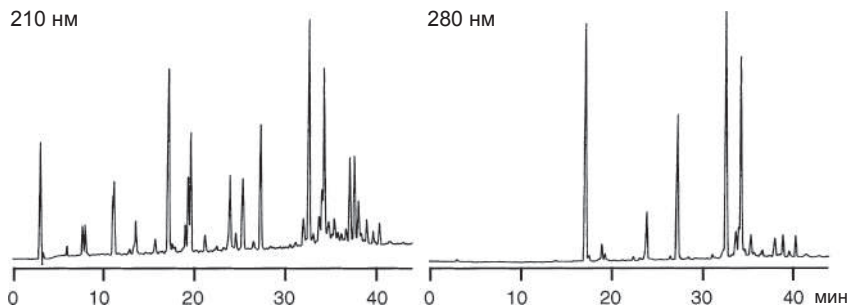


Рис. 6.7. Выбор длины волны и селективность (перепечатано с разрешения P. von Haller, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Bern). Условия: образец — продукты разложения трипсином лактальбумина; колонка 250×4,6 мм; сорбент — Aquapore butyl, 5 мкм; подвижная фаза — 1 мл/мин вода/ацетонитрил с 0,1 % трифторуксусной кислотой, градиент от 0 до 50 % ацетонитрила за 50 мин. 210 нм — неселективное детектирование, 280 нм регистрирует только пептиды, содержащие ароматические аминокислоты

Ширина спектральной полосы необязательно должна быть такой же узкой, как в регистрирующих спектрофотометрах. Обычно она составляет 10 нм (т.е. при выбранной длине волны 285 нм пропущенный свет не является монохроматическим, а содержит волны в диапазоне от 280 до 290 нм). Это дает преимущество использования более интенсивного света, что, в свою очередь, повышает чувствительность. Ширина полосы, однако, не должна быть слишком большой, иначе сократится линейный диапазон сигнала.

Детекторы с фиксированной длиной волны уже почти не выпускаются. Они работали на ртутных (254 нм), кадмиевых (229 нм) и цинковых (214 нм) лампах.

6.3. Рефрактометрические детекторы

Рефрактометрические (РМ) детекторы являются неселективными и обычно используются в дополнение к УФ-детекторам. Они регистрируют элюируемые из колонки зоны, у которых показатель преломления отличается от показателя преломления чистой подвижной фазы. Сигнал тем интенсивнее, чем больше разница между показателями преломления образца и элюента. В особо важных случаях предел обнаружения можно увеличить выбором соответствующего растворителя.

РМ детекторы примерно в 1000 раз менее чувствительны, чем УФ-детекторы (предел обнаружения около $5 \cdot 10^{-7}$ г вещества в мл элюата при наиболее благоприятных условиях против $5 \cdot 10^{-10}$ г/мл у УФ-детекторов). Поскольку показатель преломления жидкостей меняется примерно на $5 \cdot 10^{-4}$ единиц на 1°C , ячейку следует тщательно термостатировать, особенно при скорости потока выше 1 мл/мин. Ячейка встраивается в металлический блок, который служит тепловым буфером. Элюат проходит по стальному капилляру, прежде чем достигнуть



ячейки (не забываем про внеколоночные объемы!), чтобы его температура приблизилась к температуре детектора. Ячейка сравнения должна быть заполнена чистой подвижной фазой, что также немаловажно. Все это делает РМ детекторы непригодными для градиентного элюирования, если только не потратить массу времени и денег, чтобы убедиться в том, что в каждой ячейке в любой момент времени изменение в составе подвижной фазы одинаково. Любые колебания скорости подвижной фазы сильно повышают уровень шума, поэтому пульсацию необходимо скрупулезно устранять. Ячейки в выпускаемых приборах не рассчитаны на избыточное давление.

Известно несколько вариантов рефрактометрических детекторов, два из которых используются наиболее часто.

Отклоняющий рефрактометр

Ячейки в таких рефрактометрах разделены на две части под углом (рис. 6.8). Одна часть заполняется раствором сравнения, а элюат проходит через другую. Отклонение луча света изменяется, если показатели преломления отличаются друг от друга в обеих ячейках, т.е. начинает проходить некоторое количество элюируемого вещества.

Свет проходит через диафрагму, дважды через линзу (туда и обратно) и дважды через сдвоенную ячейку. Когда чистая подвижная фаза находится в измерительной ячейке, с помощью подвижной стеклянной пластинки направляют луч света на щель перед фотоэлементами. Любое изменение показателя преломления отклоняет луч света так, что часть его больше не проходит через щель. Сопротивление фотодиода меняется, и соответствующая мостовая схема меняет напряжение, появляется сигнал.

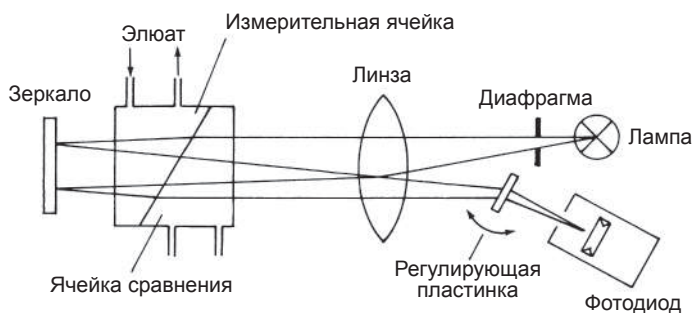


Рис. 6.8. Отклоняющий рефрактометр

Интерферометр

Свет проходит через призму двойного лучепреломления и разделяется на два луча одинаковой интенсивности. Один из лучей проходит через измерительную ячейку, а другой через ячейку сравнения, а затем оба совмещаются на второй призме, т.е. накладываются друг на друга. Если показатели преломления растворов в измерительной ячейке и ячейке сравнения различаются, это означает, что два луча не будут совпадать по фазе и будут частично гаситься на второй

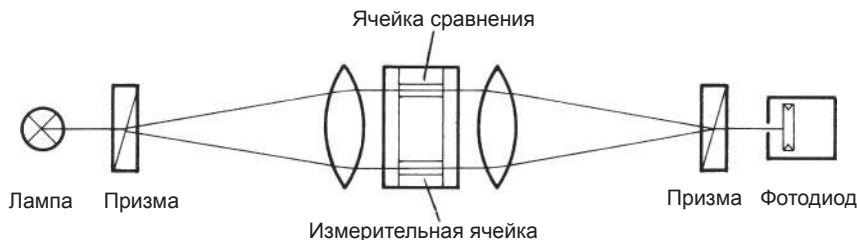


Рис. 6.9. Интерферометр

призме. Поэтому прохождение какого-либо компонента образца регистрируется как ослабление света, так же как и в других типах рефрактометрических детекторов.

Интерферометр (рис. 6.9) в 10 раз чувствительнее, чем другие рефрактометры (с аналитическими ячейками; при этом препаративные ячейки с более короткой длиной светового пути также доступны). Высокая чувствительность имеет и обратную сторону: такие детекторы чутко реагируют на изменение скорости потока или неполное уравнивание колонки. Это значит, что нужно приложить немало усилий, чтобы снизить предел обнаружения. У наиболее чувствительной ячейки объем — 15 мкл, а у наименьшей, менее чувствительной — 1,5 мкл.

6.4. Флуоресцентные детекторы

Флуоресцентным детектором (флуориметром) можно определить с высокой степенью чувствительности и селективности флуоресцирующие соединения, или соединения, имеющие флуоресцирующие производные. Чувствительность флуоресцентного детектора может превышать чувствительность УФ-детектора в 1000 раз. Свет подходящей длины волны (возбуждающее излучение) проходит

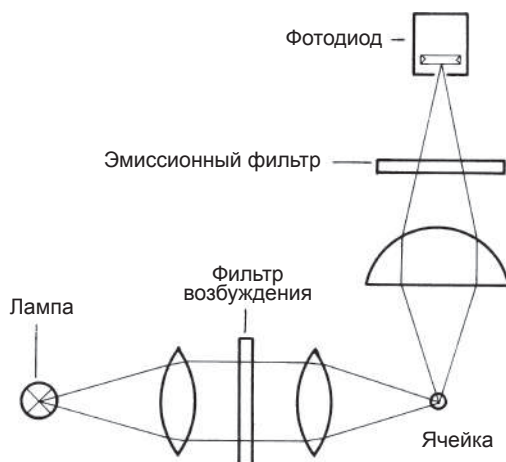


Рис. 6.10. Флуоресцентный детектор

через ячейку, а флуоресцентное излучение большей длины волны регистрируется под прямым углом к направлению поглощенного света. Интенсивность излучаемого света и, следовательно, чувствительность повышается при использовании относительно больших ячеек (20 мкл и больше). Простые детекторы, как показано на рис. 6.10, имеют фиксированную длину волны возбуждения, ширина полосы которой не должна быть слишком узкой, и фиксированную

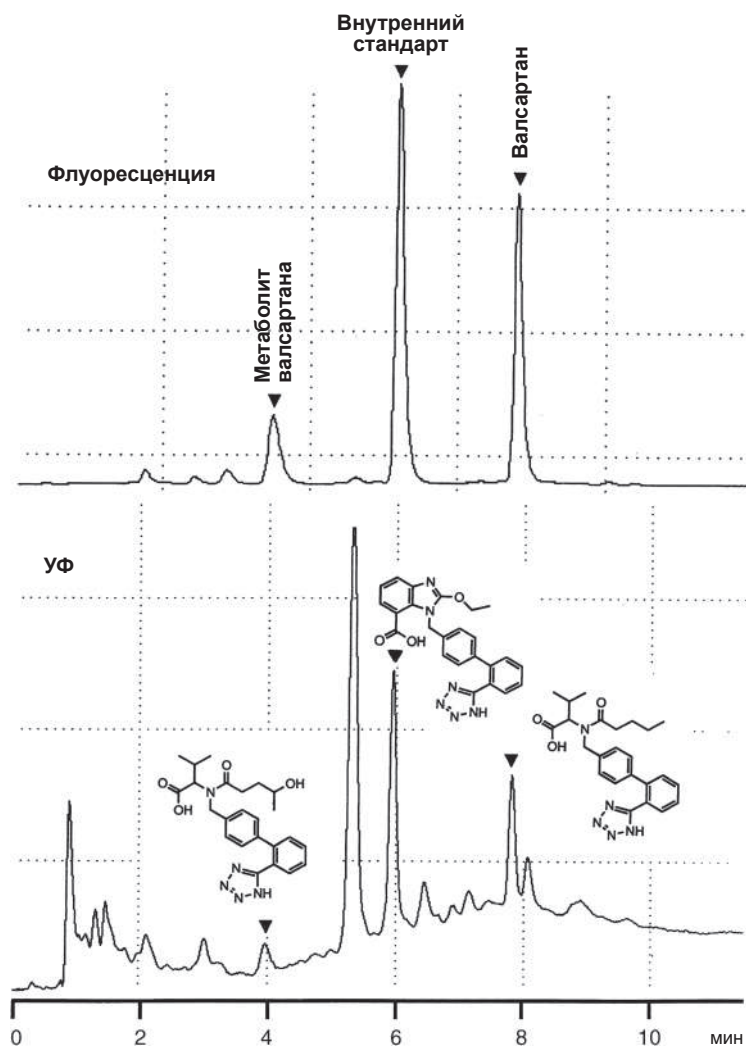


Рис. 6.11. Сравнение детектирования по флуоресценции и УФ-поглощению [перепечатано с разрешения из: G. Iriarte et al., *J. Sep. Sci.*, **29**, 2265 (2006)]. Условия: образец — 20 мкл экстракта плазмы крови с 13 нг стандарта; колонка — 100×3,9 мм; сорбент — Waters Atlantis dC18, 3 мкм; подвижная фаза — 1,3 мл/мин, 5 мМ фосфатный буфер, pH 2,5-ацетонитрил, 0,025 % ТФУ, градиент; температура — 40 °С; детектор — УФ 234 нм или флуоресценция 234/378 нм. Пики: метаболит валсартана, внутренний стандарт, валсартан (препарат для лечения гипертензии)

область длин волн для детекции флуоресцентного излучения. В более дорогих моделях флуориметров можно устанавливать определенную длину волны возбуждения. Наиболее усовершенствованные модели имеют монохроматоры возбуждающего и флуоресцентного излучений, что обеспечивает высокий уровень специфичности (хотя и меньшую чувствительность).

Следует убедиться в отсутствии соединений, которые могут гасить флуоресценцию, таких, например, как неподходящий растворитель или кислород. Линейность зависит от системы (образца, растворителя, сопутствующих компонентов) и может быть относительно небольшой.

На рис. 6.11 показано, как упрощается хроматограмма при использовании флуоресцентного детектора вместо ультрафиолетового.

6.5. Электрохимические (амперометрические) детекторы¹

С помощью электрохимического детектирования можно с большой селективностью обнаруживать следовые количества легко окисляемых или восстанавливаемых органических соединений. Предел обнаружения может быть чрезвычайно низким, а сами детекторы просты и недороги. В ячейку детектора, где проходят электрохимические реакции, встроены три электрода (рис. 6.12). Между рабочим электродом и электродом сравнения можно установить определенное напряжение. Ток, возникающий в результате электрохимической реакции, перетекает на вспомогательный электрод таким образом, что это не влияет на потенциал электрода сравнения. Рабочий электрод изготавливают из стеклоуглерода, графитовой пасты или амальгамированного золота. Зачастую используют серебряный/хлорсеребряный электрод в качестве электрода сравнения. Вспомогательный электрод представляет собой стальной блок. Он отводит ток, создаваемый электрохимической реакцией, удерживая таким образом постоянное напряжение в ячейке.

Иногда пользуются циклической вольтамперометрией, чтобы определить, какие соединения обнаруживаются этим методом, и подобрать наиболее подходящее напряжение. Ароматические гидроксисоединения, ароматические амины, индолы, фенотиазины и меркаптаны могут быть определены окислением (с положительным потенциалом). Определение восстановлением (при отрицательном потенциале) используется редко, так как растворенный кислород и тяжелые металлы (например, содержащиеся в стальных капиллярах) могут вызвать затруднения. Такой метод можно применить для определения нитрозаминов и большого ряда загрязняющих окружающую среду веществ.

Внутри ячейки должна быть подходящая для электрохимической реакции среда. Подвижная фаза должна быть электропроводной, но не обязательно водной. Неполлярные растворители и, следовательно, адсорбционная хроматография несовместимы с электрохимическим детектированием. В подвижной фазе должны отсутствовать хлориды и гидроксикарбоновые кислоты. Выход

¹ R.J. Flanagan, D. Perrett and R. Whelpton, *Electrochemical Detection in HPLC*, Royal Society of Chemistry, Cambridge (2005); B. E. Erickson, *Anal. Chem.*, **72**, 353A (2000).

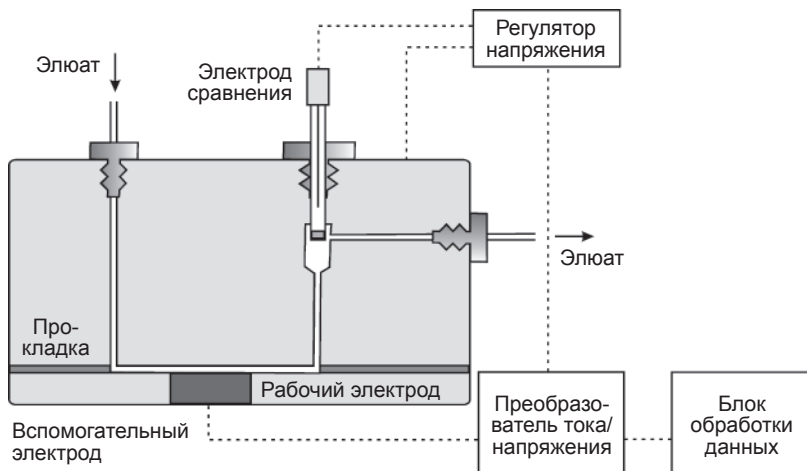


Рис. 6.12. Электрохимический детектор

в электрохимической реакции составляет не более 10 %, поэтому большая часть образца вымывается из ячейки в неизменном виде. При конверсии в 100 % детектирование называется *кулонометрическим*¹, но детектор даже при такой степени конверсии не становится чувствительнее, чем в амперометрической системе.

Специфичным методом является импульсное амперометрическое детектирование², пригодное для определения соединений с альдегидной группой, особенно углеводов. Такие соединения окисляются на серебряном или золотом рабочем электроде при высоких рН, но поверхность таких электродов быстро отравляется продуктами реакции. Поэтому потенциал таких электродов не держат постоянным, а меняют в четко установленном интервале в пределах от 0,1 до 1,0 с. Один из этих интервалов используют для определения анализируемого соединения (например, 200 мс), а другие интервалы — для очистки поверхности электрода.

Рабочий электрод и электрод сравнения электрохимических детекторов подвержены загрязнению, и их время жизни ограничено. Электрод сравнения следует заменять через 3—12 месяцев. Поверхность рабочего электрода необходимо время от времени протирать суспензией окиси алюминия для удаления налета.

6.6. Детекторы светорассеяния³

Испарительный детектор светорассеяния (ИДС; ELSD — evaporative light-scattering detector) — прибор для неселективного определения нелетучих

¹ Y. Takata, *Methods Chromatogr.*, **1**, 43 (1996).

² W. R. LaCourse, *Pulsed Electrochemical Detection in High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); T. R. I. Cataldi, C. Campa and G. E. De Benedetto, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **368**, 739 (2000).

³ C. S. Young and J. W. Dolan, *LC GC Eur.*, **16**, 132 (2003) и **17**, 192 (2004) или *LC GC North Am.*, **21**, 120 (2003) и **22**, 244 (2004). См. также раздел 26.7.

соединений. Элюат после колонки распыляется в потоке инертного газа. Затем распыленные капли жидкости испаряются, оставляя взвесь твердых частиц, через которую пропускается лазерный, светодиодный или полихроматический луч света. Полученный в результате рассеянный свет регистрируется фотодиодом или фотоумножителем (рис. 6.13).

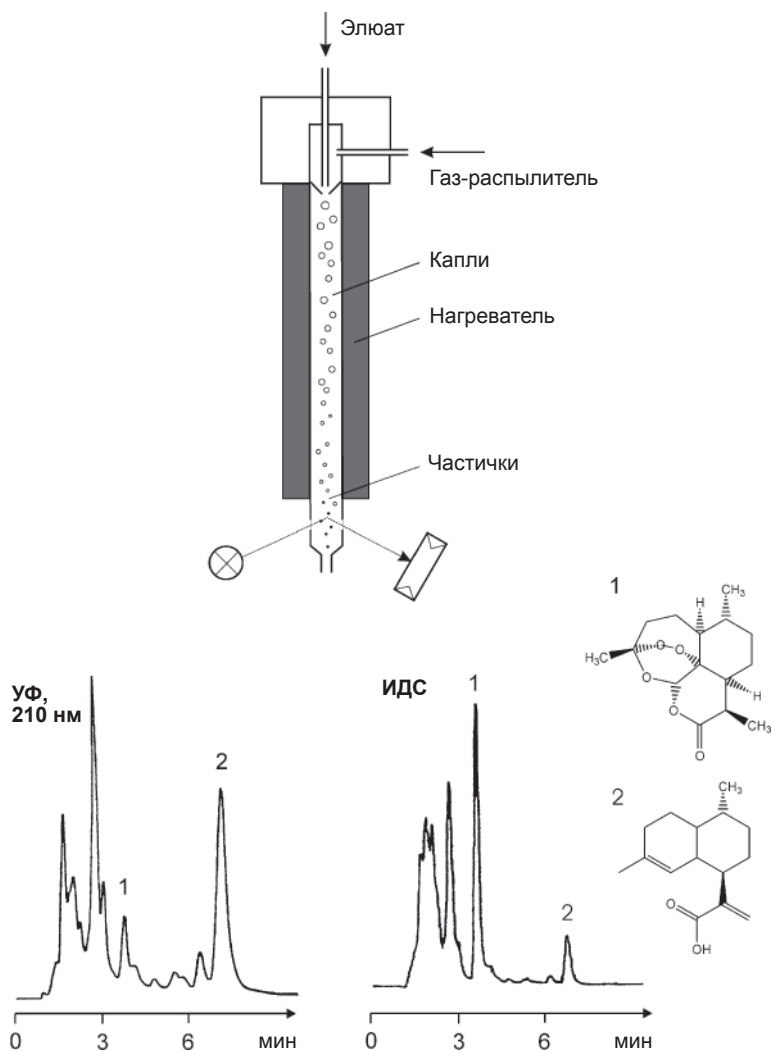


Рис. 6.13. Принцип устройства ИДС и его применение для детектирования соединений растительного происхождения. (Хроматограммы от J. L. Veuthey, Analytical Pharmaceutical Chemistry, University of Geneva.) Условия: образец — экстракт из *Artemisia annua* (полынь однолетняя); колонка — 125×4 мм; сорбент — Nucleosil 100 C₁₈, 5 мкм; подвижная фаза — 1 мл/мин, вода с ТФУ (рН 3)/ацетонитрил (39:61). Пики: 1 — артемизинин; 2 — артемизиновая кислота

Исходя из принципа работы, ясно, что подвижная фаза должна быть летучей, включая буферные соли и добавки. Летучие буферные растворы можно приготовить с муравьиной, уксусной и трифторуксусной кислотами. Все они должны быть высокой степени чистоты. Степень чистоты компонентов подвижной фазы «для градиентной ВЭЖХ» не всегда достаточна для детектирования по светорассеянию. В качестве газа-распылителя обычно используют азот, гелий или сжатый воздух.

Отклик детектора зависит от количества введенного соединения, а не от химического состава или присутствия определенных функциональных групп. На базовую линию не влияют прозрачность в УФ и коэффициент преломления подвижной фазы или изменение состава элюента, что обеспечивает полную совместимость детекторов по светорассеянию с градиентным хроматографированием. Линейный диапазон ИДС намного меньше динамического. Предел обнаружения в зависимости от вещества примерно в 10–100 раз меньше (более чувствителен), чем при детектировании по показателю преломления.

6.7. Другие детекторы

Кондуктометрические детекторы

Это классические детекторы для ионной хроматографии, измеряющие электропроводность элюата, которая пропорциональна концентрации ионов в образце (при соответствующей конструкции ячейки). Их чувствительность падает по мере увеличения специфической проводимости подвижной фазы. Объем рабочей ячейки очень мал — всего 2 мкл. У хороших кондуктометрических детекторов есть автоматическая температурная компенсация (проводимость сильно зависит от температуры) и электронное подавление фоновой проводимости. Линейный диапазон измерений у них небольшой.

Детекторы фотопроводимости

Это чувствительные, селективные детекторы для определения органических галоген- и азотсодержащих соединений. Поток элюата после колонки разделяют. Одна половина направляется через ячейку сравнения кондуктометрического детектора, а другая облучается ультрафиолетом с длиной волны 214 или 254 нм, вследствие чего определенные молекулы образца распадаются на ионные фрагменты. Полученный высокий уровень проводимости регистрируется в измерительной ячейке.

Инфракрасные детекторы

Любая органическая молекула поглощает инфракрасный свет на той или иной длине волны. При использовании ИК-детектора подвижная фаза не должна сама поглощать на установленной длине волны. Например, гексан, хлористый метилен и ацетонитрил пригодны для детектирования сложных эфиров, в то

время как этилацетат — нет. Чувствительность у таких детекторов не выше, чем у рефрактометров. Наиболее часто используемые длины волн приведены в табл. 6.1

Таблица 6.1. Используемые в ИК-детекторах длины волн

Длина волны (мкм)	Возбуждаемая связь	Для определения
3,38—3,51	C—H	Алканы
3,24—3,31	C—H	Алкены
5,98—6,09	C = C	Алкены
5,76—5,81	C = O	Сложные эфиры
5,73—6,01	C = O	Кетоны

Лазерно-индуцированная флуоресценция (ЛИФ)

Флуоресценция может быть вызвана лазерным излучением. В этом случае соотношение сигнал/шум достаточно большое, а предел обнаружения очень низкий. Однако работать можно только на нескольких длинах волн, наименьшая из которых равна 325 нм (довольно высокое значение). Поэтому анализируемые соединения необходимо дериватизировать соответствующими функциональными группами (метками).

Детекторы радиоактивности¹

Детекторы используются для определения β -излучения ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S и ^{131}I . Для детектирования такой относительно слабой радиации необходим сцинтиллятор, который добавляется в виде жидкости в элюат между колонкой и детектором или содержится в виде твердых частиц в ячейке детектора.

Описание *реакционных детекторов* приведено в разделе 19.8.

Совмещение со спектроскопическими методами (ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ИКФП, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-ЯМР) излагается в разделе 6.10.

6.8. Комплексное детектирование

Диодно-матричные детекторы (раздел 6.10) могут измерять поглощение элюата при разных длинах волн одновременно и с соблюдением соотношения между двумя экстинкциями. Получаемые хроматограммы более информативны, дают важную информацию для количественного анализа неизвестного образца и являются хорошим решением задачи, показанной на рис. 6.7. Кроме того, доступны электрохимические детекторы, которые измеряют силу тока элюата при двух разных потенциалах одновременно.

¹ A. C. Veltkamp, H. A. Das, R. W. Frei and U. A. T. Brinkman, *Eur. Chromatogr. News*, **1**(2), 16 (1987). В качестве примера см. на рис. 11.6 вещество с радиоактивной меткой ^{14}C .

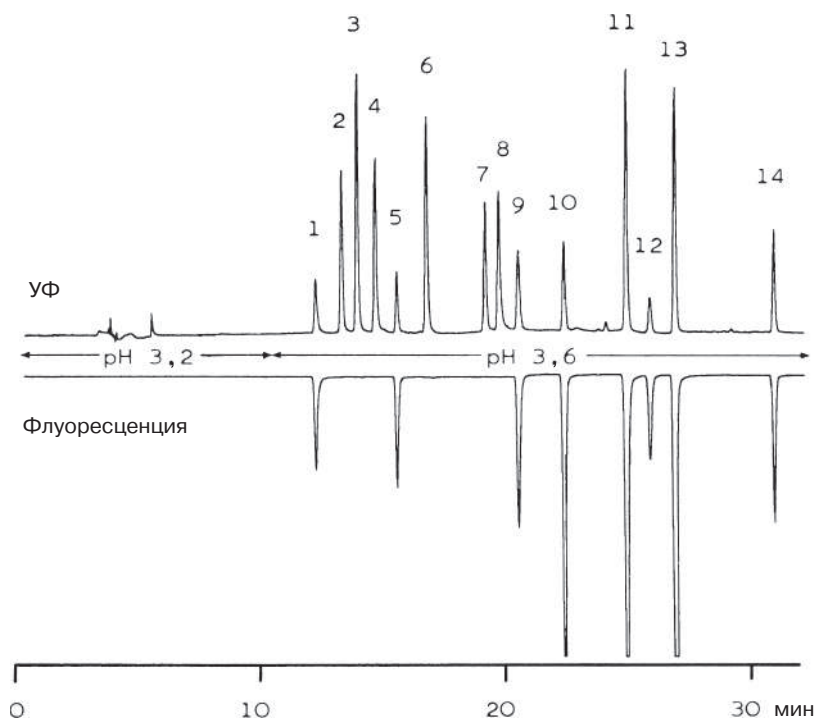


Рис. 6.14. Детекторы, установленные последовательно (перепечатано с разрешения из: G.A. Gross and A. Grüter, *J. Chromatogr.*, **592**, 271 (1992). Условия: образец — гетероциклические ароматические амины; колонка 250×4,6 мм; сорбент — TSK gel ODS80 5 мкм; подвижная фаза 1 мл/мин, вода с 0,01М триэтиламин, pH 3,2 или 3,6 и ацетонитрил, градиент; УФ, 263 нм и флуоресцентное детектирование. Пики: 1 и 5 — пиридоимидазолы; 2 и 4 — имидазохинолины; 3, 6, 7, 8 — имидазохиноксалины; 9, 10, 11, 13, 14 — пиридоиндолы; 12 — имидазопиридин

Можно установить два разных детектора подряд, как в случае, проиллюстрированном рис. 6.14, где приведен пример анализа токсичных аминов, которые могут встречаться в пищевых продуктах. Не все амины флуоресцируют. Отношение сигналов УФ-поглощения к флуоресценции можно использовать для идентификации пиков.

Вначале элюат должен проходить через детектор с наименьшим объемом ячейки, за исключением электрохимических детекторов¹, в которых вещества образца вступают в различные электрохимические реакции. В этом случае такой детектор устанавливается последним.

В особых случаях детекторы можно подсоединять параллельно через сплиттер. Неплохой пример тому — тройное параллельное детектирование катехоламинов², где электрохимический метод сопровождается двумя другими методами дериватизации с последующим флуоресцентным детектированием.

¹ В более общем случае разрушающих детекторов. — *Прим. пер.*

² H. Yoshida, S. Kito, M. Akimoto and T. Nakajima, *J. Chromatogr.*, **240**, 493 (1982).

6.9. Непрямое (косвенное) детектирование

Непрямое детектирование возможно лишь в том случае, когда подвижная фаза сама обладает свойством, воспринимаемым селективным детектором. Самым простым является не прямое УФ-детектирование¹. В этом случае используется подвижная фаза, поглощающая в УФ-области, которая может состоять из соответствующего органического растворителя или раствора какого-либо соединения с абсорбцией в УФ. При применении такого типа элюента не поглощающие ультрафиолет компоненты будут регистрироваться как отрицательные пики, так как свет будет меньше поглощаться при их прохождении через ячейку детектора. Пример непрямого детектирования приведен в разделе 13.4, где в УФ поглощают ион-парные реагенты. Подвижная фаза должна иметь поглощение 0,4 при установленной длине волны для получения максимальной точности количественного определения. Если поглощение слишком большое (больше чем приблизительно 0,8, в зависимости от используемого прибора), детектор не будет работать в линейном диапазоне и количественное определение станет невозможным. Существуют справочники для выбора реагентов в данной ситуации².

Непрямое детектирование возможно со всеми методами селективного детектирования, т. е. с флуоресцентной (если подвижная фаза сама флуоресцирует) или электрохимической (когда подвижная фаза выступает как электрохимический реагент) детекцией. Описано даже не прямое детектирование с атомно-абсорбционной спектрометрией: подвижная фаза содержит литий или медь, а в спектрометре применяется литиевая или медная лампа³.

Системные пики всегда присутствуют при не прямом детектировании и необходимо быть внимательным (см. раздел 19.9). При количественном определении следует отметить, что площадь пиков зависит не только от массы образца, но и от значения k (по отношению к значениям k системных пиков) и концентрации детектируемых компонентов подвижной фазы. Эти явления исследовались Шиллом и Кромменом⁴.

6.10. Сочетание ВЭЖХ со спектроскопией

ВЭЖХ может совмещаться с множеством других аналитических методов, но самым важным является ее сочетание со спектроскопией. Хроматография и спектроскопия — это ортогональные методы, т. е. тип получаемой информации у них разный. Хроматография — это метод разделения, а спектроскопия — метод получения «отпечатков пальцев» молекул. Атомная спектрометрия редко используется вкупе с хроматографией, хотя она позволяет обнаруживать токсичные

¹ E. E. Lazareva, G. D. Brykina and O. A. Shpigun, *J. Anal. Chem.*, **53**, 202 (1998).

² E. Arvidsson, J. Crommen, G. Schill and D. Westerlund, *J. Chromatogr.*, **461**, 429 (1989).

³ S. Maketon, E. S. Otterson and J. G. Tartier, *J. Chromatogr.*, **368**, 395 (1986).

⁴ G. Schill and J. Crommen, *Trends Anal. Chem.*, **6**, 111 (1987).

металлы в природных образцах или в металлопротеинах¹. Четыре других метода: ВЭЖХ-УФ/ДМД, ВЭЖХ-ИКФП, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-ЯМР — являются более значимыми, поскольку с их помощью можно получить спектры, проясняющие структуру молекул.

ВЭЖХ-УФ: диодно-матричный детектор²

В отличие от обычных УФ-детекторов у диодно-матричных «обратная» оптическая конфигурация. На рис. 6.15 показан принцип устройства этого прибора. Весь излучаемый свет сначала проходит через ячейку детектора, а затем разлагается по длинам волн в полихроматоре (представляющем собой решетку). После этого разложенный по длинам волн свет попадает на диодную матрицу — микросхему с большим количеством (порядка 100—1000) светочувствительных диодов, расположенных в ряд. Каждый диод принимает только одну определенную часть информации, которая считывается электроникой для обработки данных.

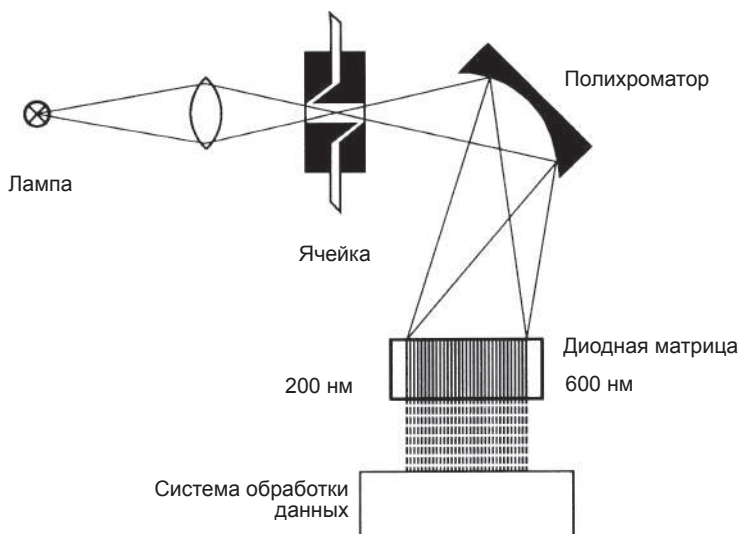


Рис. 6.15. Устройство диодно-матричного детектора

Такой тип детектора позволяет получить большой объем информации из УФ спектра образца. Наиболее существенные возможности представлены на рис. 6.16.

а) Можно получить и сохранить спектры отдельных пиков на хроматограмме. Данная процедура занимает не более 0,5 с, включая обработку дан-

¹ P. C. Uden, *J. Chromatogr. A*, **703**, 393 (1995); A. Sanz-Medel, *Anal. Spectrosc. Libr.*, **9**, 407 (1999).

² L. Huber and S. A. George, eds., *Diode Array Detection in HPLC*, Dekker, New York (1993).

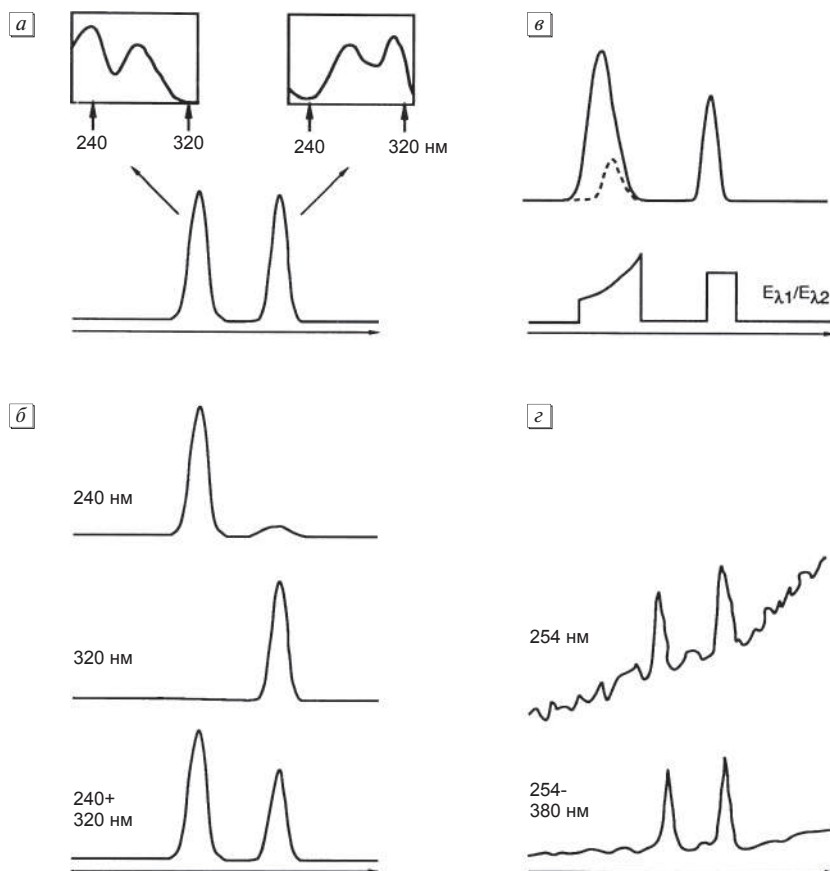


Рис. 6.16. Возможности диодно-матричного детектора: а) регистрация спектра во время разделения; б) регистрация хроматограммы на различных длинах волн; в) контроль чистоты пика; г) хроматограмма с и без вычитания профиля на референсной длине волны

ных; следовательно, можно получить несколько спектров, даже узких пиков¹. Для идентификации спектры можно сверять с библиотекой данных в он-лайн режиме. Для повышения корреляции компьютерной программой вычисляются вторые производные, при этом видно больше максимумов и минимумов, чем у исходного спектра.

б) Знание спектров соединений в образце позволяет установить определенную длину волны детектирования. Можно исключить мешающие пики (см. также рис. 6.7). За счет надлежащего выбора условий детектирования можно точно рассчитать количество анализируемого соединения, даже при условии плохого разрешения. Можно менять длину волны детектирования во время анализа.

¹ На самом деле, при использовании ДМД производится регистрация полного спектра проходящего через детектор элюата в каждой точке на всей хроматограмме (с заданной частотой и в заданном диапазоне длин волн), и это занимает столько времени, сколько длится сам процесс разделения. — *Прим. пер.*



в) Одновременное детектирование при двух разных длинах волн позволяет определить соотношение коэффициентов поглощения¹. Если такое соотношение остается постоянным по всей ширине пика, то можно предположить, что вещество чистое (за исключением полного совпадения двух пиков с одинаковым профилем или примесей с идентичным УФ-спектром). Меняющееся соотношение указывает на то, что вещество, которому соответствует данный пик, не чистое.

г) Вычитание сигнала, получаемого на одной длине волны, из сигнала, получаемого на другой длине волны, позволяет уменьшить дрейф и шумы базовой линии в градиентной элюции. Вычитаемую длину волны можно выбрать произвольно на любом участке спектра, где ни одно из интересующих соединений не поглощает.

ВЭЖХ-ИКФП²

Сочетание хроматографии с инфракрасной спектроскопией с Фурье-преобразованием позволяет получать инфракрасные спектры. Предел обнаружения довольно высокий (т.е. не самый лучший), если используется проточная ячейка. Большой интерес представляют более универсальные детекторы, совмещенные с удалением растворителя, но они технически существенно сложнее. Они способны регистрировать даже следовые количества вещества. Подвижная фаза должна быть летучей, возможно, водной.

ВЭЖХ-МС³

Масс-спектрометры для ВЭЖХ состоят из трех разных частей: источника ионизации, куда вводится элюат и где генерируются ионы, анализатора масс и детектора электронного умножителя, который определяет интенсивность ионного потока. Благодаря различным способам образования ионов при атмосферном давлении ВЭЖХ-МС могут быть достаточно малозатратными. Основными (наиболее распространенными — *прим. перев.*) методами ионизации являются ХИАД и ИЭР.

ХИАД: химическая ионизация при атмосферном давлении (рис. 6.17).

- а) Ионы генерируются коронным разрядом (3—6 кВ).
- б) Образуются молекулярные ионы $(M+H)^+$ (нет спектров), отрицательная ионизация также возможна.
- в) Применима к небольшим, средним и неполярным молекулам, но эти молекулы должны обладать сродством к протону и быть летучими.

¹ I. N. Papadoyannis and H. G. Gika, *J. Liquid Chromatogr.*, **27**, 1083 (2004).

² G. W. Somsen, C. Gooijer and U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **856**, 213 (1999).

³ *LC GC Eur., Guide to LC-MS*, Advanstar, Dec. 2001; R. Willoughby, E. Sheehan and S. Mitrovich, *A Global View of LC/MS*, Global View Publishing, Pittsburgh, 2nd ed., 2002; R. E. Ardrey, *Liquid Chromatography — Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester (2003); M. C. McMaster, *LC-MS A Practical User's Guide*, Wiley-Interscience, Hoboken, 2005.

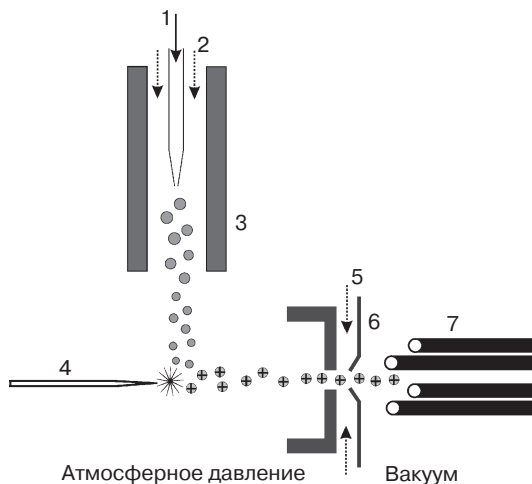


Рис. 6.17. Интерфейс ВЭЖХ-МС для ХИАД. 1 — из колонки; 2 — газ-распылитель; 3 — нагреватель; 4 — игла коронного разряда; 5 — газ-осушитель; 6 — скиммер (фокусирующая линза); 7 — квадруполь

- г) Не подходит для термолabileльных веществ.
- д) Для водных и неводных подвижных фаз скорость потока должна составлять, как минимум, 1 мл/мин¹.
- е) Неводные элюенты не нуждаются в добавках; во время ионизации могут происходить реакции с растворителем.
- ж) Водные элюенты могут требовать добавки для эффективной ионизации.
- з) Сигнал, чувствительный к массе.

ИЭР, или ИЭРАД: ионизация электрораспылением (при атмосферном давлении) (рис. 6.18).

- а) Ионы образуются кулоновским взрывом (распадом) электрически заряженных капель.

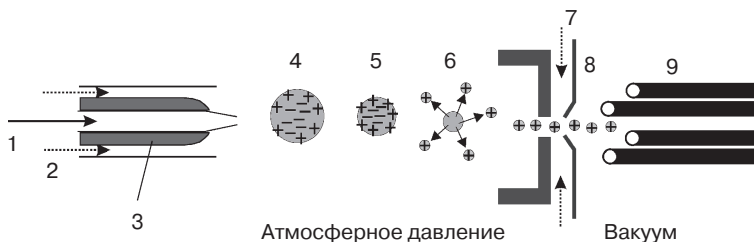
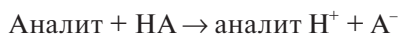


Рис. 6.18. Интерфейс ВЭЖХ-МС для ИЭР. 1 — из колонки; 2 — газ-распылитель; 3 — высокое напряжение; 4 — заряженные капли (изображенные слишком крупными); 5 — испарение; 6 — кулоновский взрыв; 7 — газ-осушитель; 8 — скиммер (фокусирующая линза); 9 — квадруполь

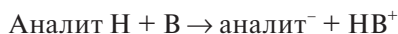
¹ Для современных детекторов таких ограничений нет. — Прим. пер.



- б) Образуются однозарядные и многозарядные ионы. В последнем случае получаются спектры с множеством пиков одного и того же анализируемого соединения (аналита), но с разным соотношением m/z , которые не следует путать с классическими спектрами, указывающими на молекулярные фрагменты.
- в) Применима к термолabile веществам и макромолекулам, включая биополимеры.
- г) Применима для водных элюентов. Поток должен быть небольшим, следовательно, этот способ детектирования подходит для микро-ВЭЖХ.
- д) Для положительной ионизации при $pH \approx 5$ в качестве добавок используются муравьиная и уксусная кислоты, иногда вместе с ацетатом аммония:



- е) Для отрицательной ионизации при $pH \approx 9$ в качестве добавки используют ионы аммония, триэтиламин и диэтиламин, иногда с ацетатом аммония.



- ж) Сигнал, чувствительный к концентрации.

Квадруполь и ионные ловушки — это наиболее часто используемые масс-анализаторы. Обе системы достаточно недороги и надежны, но их разрешение ограничено примерно 1 Да.

Ионы можно пропускать через несколько масс-анализаторов и фрагментаций, устанавливая их последовательно, получая, таким образом, больше информации о структуре. Такие методы известны как МС-МС (двухступенчатые) или МС^{*n*} (*n*-ступенчатые).

ВЭЖХ-ЯМР¹

Ядерный магнитный резонанс можно совмещать с ВЭЖХ при соответствующем выборе растворителей (один сигнал от растворителя можно подавить, но не следует допускать другие сигналы, используя дейтерированные растворители) и если концентрация анализируемого соединения не слишком мала. Предел обнаружения зависит от напряженности магнитного поля, следовательно, необходимо использовать приборы с частотой 500—800 МГц. Если концентрация вещества достаточно высокая, ее можно определять в он-лайн режиме в ВЭЖХ-ЯМР разделениях. Хотя обычно отдельные пики после ВЭЖХ накапливаются в петле, а затем через довольно длинный временной интервал получают спектры.

ЖХ-УФ, ЖХ-МС, ЖХ-ЯМР можно комбинировать², как показано на рис. 6.19, иллюстрирующем эксперименты по выяснению структуры молекул из растительного экстракта.

¹ K. Albert et al., *J. High Resolut. Chromatogr.*, **22**, 135 (1999); K. Albert, *J. Chromatogr. A*, **856**, 199 (1999); K. Albert, ed., *On-line LC-NMR and Related Techniques*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.

² J. L. Wolfender, K. Ndjoko and K. Hostettmann, *J. Chromatogr. A*, **1000**, 437 (2003).

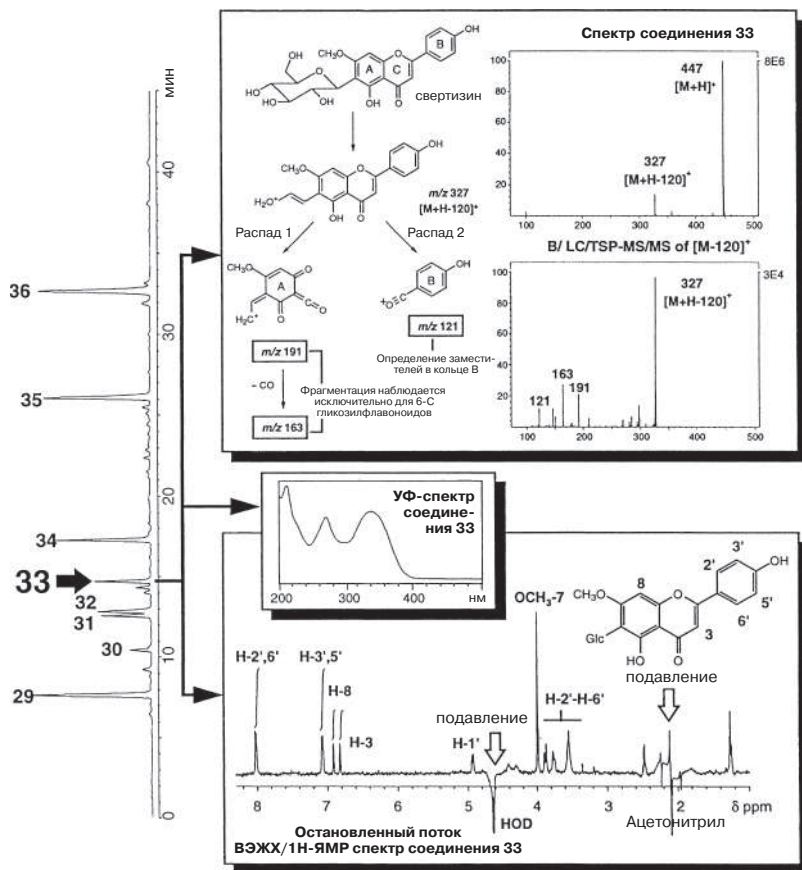


Рис. 6.19. Идентификация пиков веществ с помощью ЖХ-МС, ЖХ-МС-МС, ЖХ-УФ и ЖХ-ЯМР (воспроизведено с разрешения из: J. L. Wolfender, S. Rodriguez and K. Hostettmann, *J. Chromatogr. A*, **794**, 299 (1998)). Хромотограмма (вертикальная): образец — экстракт из *Gentiana ottonis*; колонка — 150×3,9 мм с предколонкой; сорбент — C18 Nova-Pak, 4 мкм; подвижная фаза — 1 мл/мин вода/ацетонитрил с 0,05 % трифторуксусной кислотой; градиент от 5 до 65 % ацетонитрила за 50 мин; детектор УФ, 254 нм. МС: источник ионизации, термораспыление; анализатор, квадруполь. УФ: диодная матрица. ЯМР: D₂O вместо H₂O; остановленный поток; 500 МГц. Пик 33 — это гликозилфлавоноид вертизин

ГЛАВА 7

КОЛОНКИ И СОРБЕНТЫ

7.1. Колонки для ВЭЖХ

В большинстве случаев колонки для ВЭЖХ изготавливаются из *нержавеющей стали* марки 316, являющейся аустенитной хромоникельмолибденовой сталью, американского стандарта AISI, устойчивой к давлениям, используемым в ВЭЖХ, и относительно устойчивой к химической коррозии (за исключением присутствия ионов хлорида и лития при низких pH). Внутренняя поверхность колонок должна быть гладкой, без царапин или микроскопических трещин, поэтому стальные трубки должны либо точно высверливаться, либо полироваться, либо электрополироваться после изготовления обычным способом, т.е. волочением (прокатом).

Стекланные трубки — гладкие, химически инертные (они совершенно не влияют на вещества в образце) и не корродируют. В ВЭЖХ стекло используется для остекловывания/облицовки внутренней поверхности стальных трубок, выдерживающих высокое давление.

В редких случаях используется *тантал*. Он меньше корродирует, чем сталь, и поверхность его гладкая. Тантал, однако, менее пластичен, поэтому фитинги приходится скорее приклеивать, чем запрессовывать. Это весьма дорого.

ПЭЭК (полиэфирэфиркетон) — устойчивый к давлению пластик, упоминавшийся в разделе 4.4, может использоваться для изготовления не только капилляров, но и колонок.

Гибкие *полиэтиленовые трубки*, прижатые изнутри гидравлическим потоком к стенкам жестких оболочек, представляют собой особый класс колоночных устройств (Waters). Стенка подобной колонки получается такой, что при упаковке сорбентом не происходит образование пристеночных эффектов и каналов.

Колонки с внутренним диаметром 2—5 мм используются в основном для аналитических целей. Колонки с большим диаметром от 10 до 25,4 мм можно применять для препаративного разделения. Некоторые производители выпускают препаративные колонки диаметром даже 30 см и более. Микро- и капиллярные колонки рассматриваются в разделе 23.1.

Колонки длиной 5, 10, 15 или 25 см применяются в основном для десяти-микронных (и менее) сорбентов. Если требуется увеличить число теоретиче-

ских тарелок, то лучше взять сорбент с меньшими частицами, чем удлинять колонку¹.

Удлинение колонки увеличивает объем удерживания, что снижает концентрацию вещества в элюате (см. раздел 19.2) и увеличивает предел обнаружения. Тем не менее в препаративных целях используются колонки длиной до 1 м.

На рис. 7.1 изображены разные варианты концевых соединений колонок. У первых коммерчески доступных колонок была наружная резьба (модель А). Колонку с такой конфигурацией можно использовать годами при бережной эксплуатации, т. е. без излишнего затягивания. При применении большего, чем необходимо, усилия фитинги очень быстро начнут течь. Модель В — усовершенствованная и проще в эксплуатации. Впрочем, на качество колонки выбор модели не влияет.

Вариант С — конструкция с картриджем. Колонка располагается внутри внешнего корпуса и удерживается двумя стопорными гайками. У самой колонки отсутствуют фитинги, что, соответственно, ее удешевляет, в дополнение к этому, ее легко заменить без инструментов и она может быть присоединена к другим колонкам (при помощи подходящих адаптеров) без лишних внеколоночных объемов.

Колонка завершается стальными фильтрами, диаметр пор которых меньше, чем диаметр частиц сорбента. Стандартный диаметр пор фильтра составляет

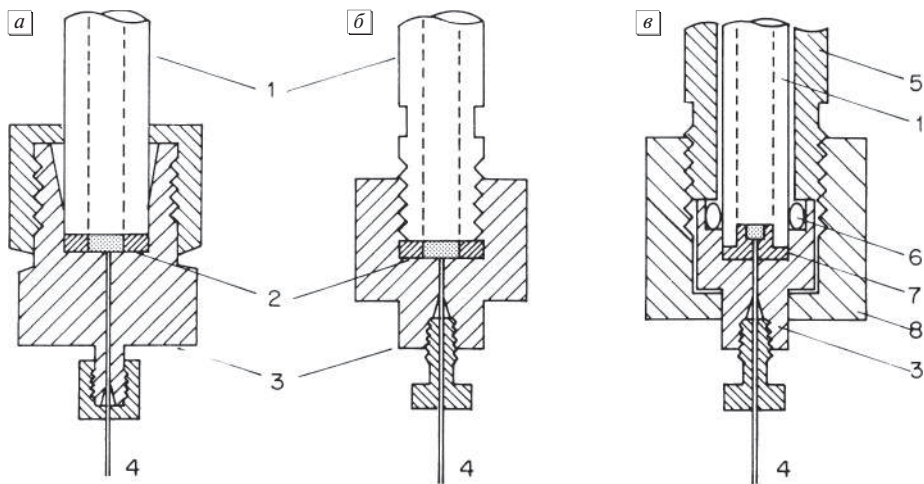


Рис. 7.1. Варианты соединений колонок: а) соединение с наружной резьбой; б) соединение с внутренней резьбой; в) картриджная система (упрощенная схема). 1 — колонка; 2 — металлокерамический и Kel-F фильтры; 3 — соединение; 4 — 1/16 дюймовый капилляр; 5 — корпус; 6 — уплотнение высокого давления; 7 — уплотнение колонки с фильтром; 8 — стопорная гайка

¹ Это справедливо до определенного предела. Если, например, необходимо получить 25000 ТТ, то лучший выбор — это колонка длиной 150 мм с 3-мкм сорбентом или 250 мм с 5-мкм, а не 100 мм с 1,7-мкм, поскольку на ней будет очень высокое давление. — *Прим. пер.*



2 мкм, но сорбентам с частицами 3,5 мкм и меньше нужны 0,5-мкм фильтры. При засорении фильтра его лучше заменить. Если не можете себе этого позволить, постарайтесь очистить его ультразвуком¹.

Преимущества колонок малого диаметра

Колонки малого внутреннего диаметра обладают двумя основными преимуществами² перед колонками большего диаметра:

- а) меньший расход растворителей (меньше уходит в отход). Объем удерживания V_R пропорционален *квадрату* диаметра колонки $d_{\text{кол}}$:

$$V_R \sim d_{\text{кол}}^2 \left(\text{так как } V_R = (k+1) \frac{\varepsilon d_{\text{кол}}^2 \pi L_{\text{кол}}}{4} \right).$$

Если для элюции пика с колонки диаметром 4,6 мм требуется 10 мл подвижной фазы, то соответственно:

4,8 мл для колонки диаметром 3,2 мм,

1,9 мл для колонки диаметром 2,0 мм,

0,5 мл для колонки диаметром 1,0 мм (в 20 раз меньше!);

- б) большее соотношение высоты сигнала к массе образца. Максимальная концентрация c_{max} *обратно пропорциональна* квадрату диаметра колонки $d_{\text{кол}}$:

$$c_{\text{max}} \sim \frac{1}{d_{\text{кол}}^2} \left(\text{так как } c_{\text{max}} = \frac{c_i V_i}{V_R} \sqrt{\frac{N}{2\pi}}, \text{ см. раздел 19.22 и } V_R \sim d_{\text{кол}}^2 \right).$$

Если, например, 1 мкг вещества дает сигнал высотой 0,1 мВ после колонки диаметром 4,6 мм, то это соответствует:

0,21 мВ для колонки диаметром 3,2 мм,

0,53 мВ для колонки диаметром 2,0 мм,

2,1 мВ для колонки диаметром 1,0 мм (сигнал выше в 20 раз!).

7.2. Предколонки

Как показано на рис. 7.2, существует два варианта применения предколонок.

Предколонки, устанавливаемые перед инжектором, служат для насыщения подвижной фазы. Сорбент в этих предколонках будет частично растворяться, и такой тип предколонок называют преднасыщающими колонками.

¹ В случае современных колонок лучше этого не делать. Разборка колонки с большой вероятностью приведет к потере ее эффективности даже в том случае, если вы тщательно очистите фильтр. Лучше предотвратить загрязнение фильтра с помощью предколонки или префильтра, которые можно менять без ущерба эффективности колонки. — *Прим. пер.*

² Кроме преимуществ, они обладают и недостатками. Большинство коммерчески доступных хроматографических систем не могут эффективно использовать колонки диаметром менее 3 мм, набитые сорбентом менее 3 мкм, из-за экстраколоночных объемов. Кроме того, эффективность таких колонок меньше, чем аналогичных большего диаметра, вследствие пристеночных эффектов. — *Прим. пер.*

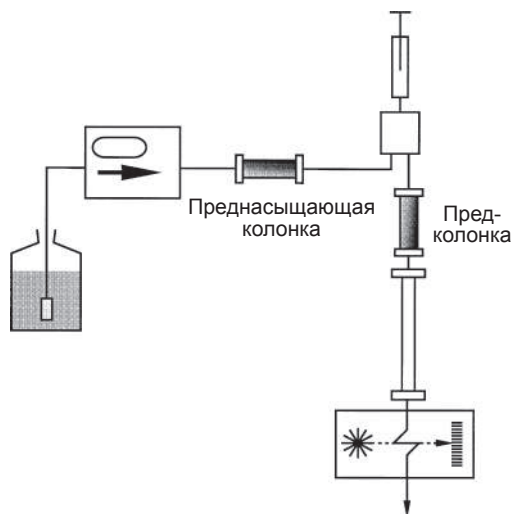


Рис. 7.2. Предколонки

используются также как средство защиты от загрязнения и устанавливаются между инжектором и колонкой. Они упакованы такой же или химически сходной стационарной фазой, как и основная колонка, и предотвращают ее загрязнение сильно удерживаемыми примесями¹. Это особенно важно при анализе биологических жидкостей или напитков, как в примере на рис. 1.2. При правильном выборе и установке предколонка не влияет на разделение. Предколонки следует регулярно менять через определенный промежуток времени или после некоторого числа разделений, чтобы максимально продлить время жизни разделяющей колонки.

7.3. Основные свойства сорбентов²

Как уже было упомянуто в разделе 2.2, большого числа теоретических тарелок можно достигнуть лишь сокращением пути диффузии молекул в порах стационарной фазы³. Поэтому в ВЭЖХ отдают предпочтение микрочастицам. Молекула не может проникнуть глубже чем на 2,5 мкм в частицу размером 5 мкм. Хроматограммы двух разделений фенолов на рис. 7.3 показывают, как увеличивается производительность системы при использовании частиц малого диаметра. Колонка длиной 20 см, заполненная сорбентом 10 мкм, имеет около 7000

В небольшой степени элюент растворяет диоксид кремния с образованием кремниевой кислоты. Эффект возрастает с увеличением полярности, ионной силы и при высоких значениях pH подвижной фазы. Колонка-поглотитель заполняется крупнозернистым силикагелем и используется для защиты разделяющей колонки от растворения, если используется стационарная фаза на основе оксида кремния или его производных. Она будет насыщать кремниевой кислотой подвижную фазу на входе в колонку, продлевая, таким образом, ее время жизни.

В отличие от предыдущего варианта применения, предколонки

¹ И механическими примесями тоже. — *Прим. пер.*

² M. R. Buchmeiser, *J. Chromatogr. A*, **918**, 233 (2001).

³ На самом деле, как это показано в недавней работе Fabrice Gritti, Georges Guiochon Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency *Journal of Chromatography A*, **1221** (2012), для современных колонок наибольший вклад в высоту ТТ вносит продольный коэффициент диффузии (коэффициент B в уравнении Ван-Деемтера) и эффекты, связанные с вихревой дисперсией (коэффициент A). — *Прим. пер.*

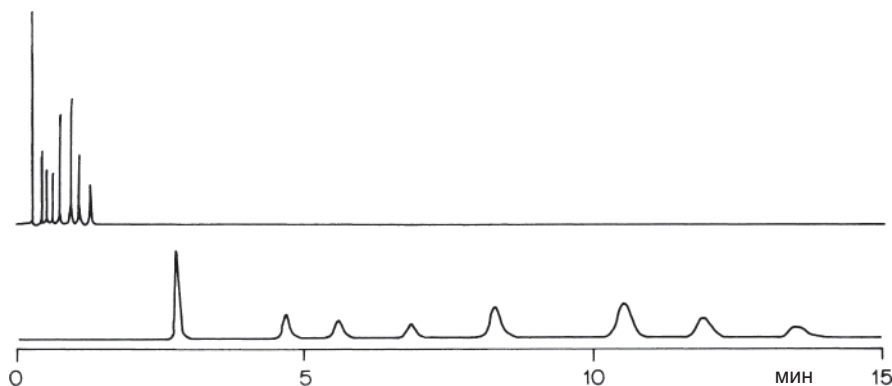


Рис. 7.3. Сравнение эффективности сорбентов, различающихся по размеру частиц. Вверху: колонка $60 \times 4,6$ мм с частицами 3 мкм ODS-Hypersil, скорость потока 2 мл/мин. Внизу: колонка $200 \times 4,6$ мм с частицами 10 мкм ODS-Hypersil, скорость потока 0,7 мл/мин. Подвижная фаза: ацетонитрил-вода (1:1). Образец: 1 мкл смеси фенолов (Hewlett-Packard)

теоретических тарелок (нижняя хроматограмма), в то время как для колонки с 3-мкм частицами для достижения такого же ЧТТ достаточно длина всего лишь в 6 см. Анализ в первом случае проходит за 15 мин, а во втором занимает только одну десятую часть этого времени. Такое значительное сокращение продолжительности анализа происходит благодаря уменьшению длины колонки и тому, что на сорбенте с малыми размерами частиц Ван-Деемтеровский минимум достигается при более высоких скоростях потока, чем на более крупных частицах. Но, несмотря на небольшую длину, давление будет примерно в 10 раз выше, чем при разделении на крупнозернистом сорбенте.

Разброс размера частиц¹ должен быть как можно меньшим (с соотношением наименьшего и наибольшего диаметра частиц 1:1,5 или 1:2, как уже было упомянуто). Маленькие частицы создают большое сопротивление потоку, а крупные частицы являются причиной сильного уширения хроматографической полосы. По этой причине многие выпускаемые сорбенты сопровождаются сведениями о размере частиц.

Пример

$d_{10} = 4$ мкм, $d_{50} = 5$ мкм, $d_{90} = 7$ мкм. Это означает, что:

- 10 % частиц меньше 4 мкм;
- 50 % частиц меньше 5 мкм;
- 90 % частиц меньше 7 мкм,

но ничего не говорит о том, насколько много или мало частиц находится в двух крайних значениях. Представленное распределение по размерам частиц может показаться необычным, но оно основано на практическом методе анализа раз-

¹ R. E. Majors, *LC GC Int.*, **7**, 8 (1994) или *LC GC Mag.*, **11**, 848 (1993).

мера частиц, например просеивание, воздушная сепарация (пневмосепарация), осаждение, оптический метод и счетчик Коултера.

Свойства сорбентов одного и того же производителя могут отличаться от партии к партии, поэтому следует приобретать сразу большое количество сорбента одной партии для серийных анализов в течение длительного периода¹.

Используются разные типы стационарных фаз: полностью пористые частицы, непористые частицы малого диаметра, поверхностно-пористые частицы, перфузионные частицы и монолитные материалы.

Полностью пористые частицы

Это самый распространенный тип стационарной фазы ВЭЖХ. Они бывают размером 1,8; 3,0; 3,5; 5,0 или 10 мкм. Как правило, их эффективность, т.е. число теоретических тарелок на единицу длины, удваивается с каждым разом от 10 к 5 и 3 мкм, тогда как перепад давления с каждым разом возрастает в 4 раза. У них пористая внутренняя структура, которая сильно напоминает губку (но, в отличие от губки, они очень твердые). Внутри пор нет потока подвижной фазы и анализируемых соединений, а есть только перемещения, обусловленные диффузией.

Непористые частицы малого диаметра

Если стационарная фаза непористая, то вклад массопереноса в уширение пика, т.е. параметр C в уравнении Ван-Деемтера (см. разделы 2.2 и 8.6), исчезает или становится совсем небольшим, так как отсутствует диффузия внутрь пор. И, как следствие, кривая становится очень пологой справа от своего минимума, и быстрая хроматография может проходить без потери эффективности разделения. На рис. 1.1 представлен пример разделения восьми соединений за 70 с. Чтобы сохранить на определенном уровне емкость сорбента (т.е. удельную поверхность), необходимо использовать небольшие частицы диаметром 1—2 мкм. Емкость у них примерно в 50 раз ниже, чем у стандартных пористых фаз, а перепад давления высокий. Объем удерживания пиков небольшой, так как отсутствуют поры. Доля жидкости в колонке (пористость колонки ϵ) составляет примерно 0,4 против 0,8 у колонки с пористым сорбентом. Следовательно, внеколоночные объемы и временные константы детектора необходимо уменьшить до минимума. По всей видимости, предпочтительнее разделять на таких стационарных фазах биополимеры из-за их возможной денатурации и проблем, связанных с необратимой сорбцией анализируемых соединений.

Поверхностно-пористые сорбенты

Это крупные частицы до 30 мкм в диаметре, которые можно упаковывать в сухом виде. Они состоят из непористого ядра (например, стекла), покрытого слоем в 1—3 мкм хроматографически активного материала. Гранулы с пористым

¹ В настоящее время нужда в этом отпала, поскольку производители научились делать сорбенты и колонки с хорошо воспроизводимыми свойствами. — *Прим. пер.*



слоем (ГПС) редко используются в настоящее время, но их иногда используют в предколонках или для восстановления бывшей в употреблении и потерявшей в качестве колонки с просевшим сорбентом¹.

Перфузионные частицы

Так же как и непористые частицы, перфузионные сорбенты были разработаны для быстрого разделения биополимеров. Они состоят из сильно сшитого стиролдивинилбензола с двумя типами пор: больших *проходных пор* диаметром 600—800 нм и узких *диффузионных пор* диаметром 80—150 нм. Активная стационарная фаза (например, обращенная, ионообменная или аффинная) полностью покрывает внешнюю и внутреннюю поверхности частиц. Проходные поры достаточно широки, чтобы подвижная фаза могла свободно протекать сквозь них, в то время как в диффузионных порах она застывает. Поскольку анализируемые вещества быстро переносятся внутрь и наружу потоком элюента, а диффузионный путь в узких порах короткий, разделение становится быстрым, с приемлемой кривой Ван-Деемтера (рис. 7.4). В действительности нет нужды (да и невозможно) делать маленькие частицы: обычный их размер равен 20 мкм. Их сопротивление потоку очень низкое.

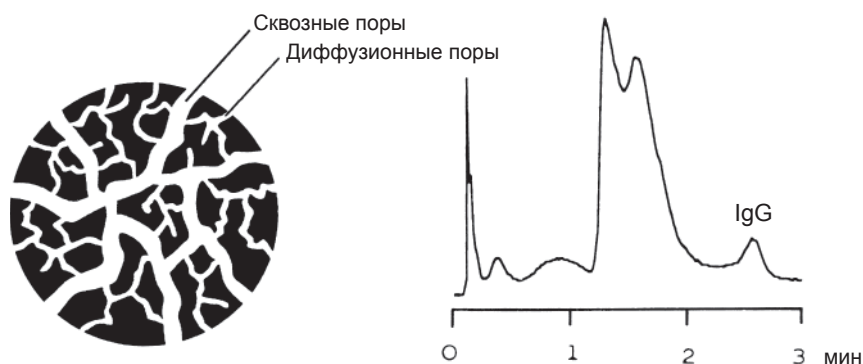


Рис. 7.4. Хроматография гидрофобных взаимодействий на перфузных частицах. Слева: частицы стационарной фазы; справа: быстрое разделение иммуноглобулинов G из клеточной культуры (воспроизведено с разрешения N. B. Afeyan, S. P. Fulton and F. E. Regnier из *J. Chromatogr.*, **544**, 267 1991). Условия: колонка 100×4,6 мм, сорбент Poros M с гидрофобной поверхностью, 20 мкм; подвижная фаза — градиент от 2 до 0 М сульфата аммония в воде за 5 мин, 10 мл/мин; УФ-детектор, 280 нм

¹ Это было справедливо до 2010 г. В настоящее время ГПС все чаще и чаще используются на практике, так как они совмещают в себе преимущества полностью пористых частиц (большая емкость сорбента) и непористых частиц (высокая эффективность разделения). В основном это частицы размером 2,6—2,7 мкм с твердым ядром 1,7—1,9 мкм и пористой оболочкой 0,35—0,5 мкм. Более подробно см.: S. Fekete, E. Olah, J. Fekete, Fast liquid chromatography: the domination of core-shell and very fine particles, *J. Chromatogr. A* **1228** (2012) 57—71. — *Прим. пер.*

Монолитные стационарные фазы¹

Можно создать стационарную фазу из единого куска пористого материала: органического полимера либо силикагеля (рис. 7.5). При таком подходе колонка заполняется не частицами, а пористым стержнем, который полностью заполняет ее цилиндрический объем. Диаметр крупных пор (сквозь которые протекает

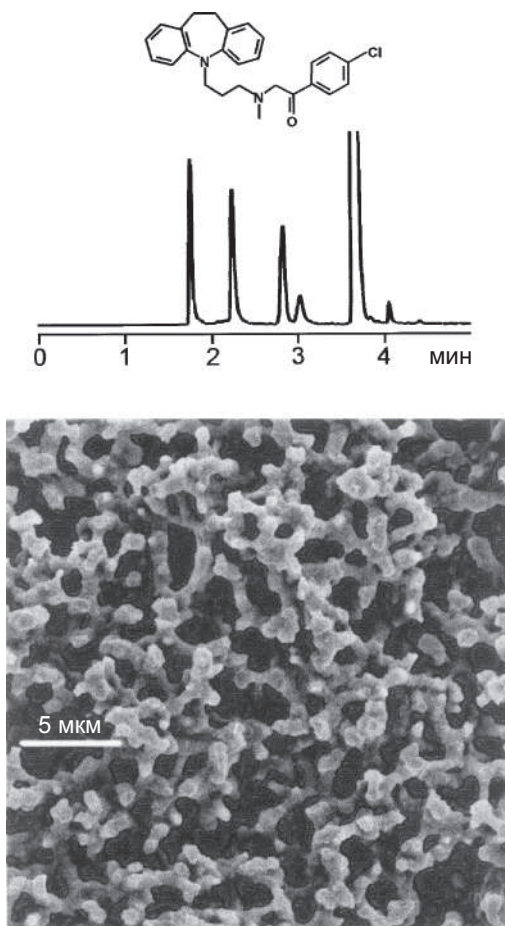


Рис. 7.5. Монолитные стационарные фазы (воспроизведено с разрешения Merck). Сверху: разделение гамонила и его побочных продуктов. Условия: колонка 83×7,2 мм; сорбент — SilicaROD RP 18e; подвижная фаза — вода с 20 мМ фосфорной кислотой — ацетонитрил; комбинированный градиент по растворителю и скорости потока — от 10 до 50 % ацетонитрила и от 3 до 9 мл/мин; УФ-детектор, 256 нм. Внизу: микрофотография стационарной фазы

¹ Т. Ikegami and N. Tanaka, *Curr. Opinion Chem. Biol.*, **8**, 527 (2004); F. Svec, *J. Sep. Sci.*, **27**, 747 (2004) (на основе органических полимеров); I. Ali, V. D. Gaitonde and H. Y. Aboul-Enein, *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 432 (2009) (на основе силикагеля); K. Mistry and G. Grinberg, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.*, **28**, 1055 (2005); G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **1168**, 101 (2007).



подвижная фаза) составляет примерно 2 мкм, средний диаметр пор каркасной структуры равен около 1,6 мкм, а диаметр мезопор — около 12 нм. Пористость таких материалов равна примерно 0,8, а их разделительная способность такая же, как у трехмикронных пористых частиц, к тому же такие колонки характеризуются весьма пологой кривой Ван-Деемтера. Для монолитных фаз не нужны колоночные фильтры. Каждая колонка единична, не существует колонок «одной серии». Зачастую можно напрямую наносить «грязные» образцы (сыворотку, пищевые экстракты) без каких-либо потерь в разделении или времени жизни колонки¹.

7.4. Силикагель²

Силикагель — адсорбент, обладающий исключительными свойствами. Его можно использовать для эксклюзионной хроматографии и в качестве основы для многочисленных химически привитых стационарных фаз. Он состоит из атомов кремния, соединенных в трехмерном пространстве атомами кислорода.

На рис. 7.6 показано, что поверхность покрыта ОН-группами, так называемыми силанольными группами. Из-за аморфности вещества, имеющего разнородную поверхность, сложно получить четко определенный силикагель. Хотя все функциональные группы на поверхности являются центрами адсорбции, разные их типы обладают различными свойствами:

- а) свободные силанолы являются слабыми кислотами, следовательно, на них скорее будут адсорбироваться основания. Это может повлечь размывание заднего фронта пика;
- б) силанолы, присоединенные к одному атому (геминальные), не являются кислотами;

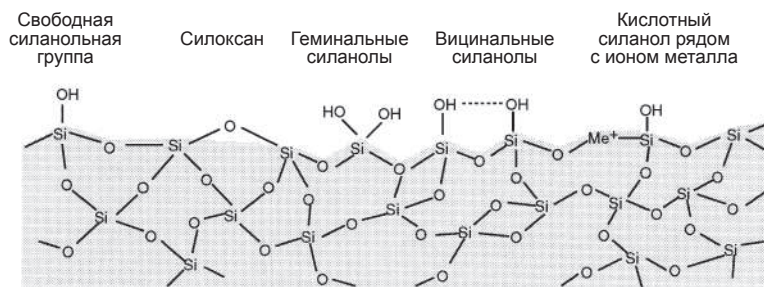


Рис. 7.6. Химическая структура силикагеля

¹ Можно, но не нужно. Рано или поздно умирают все колонки. Грязные образцы сокращают время жизни и колонок с монолитными фазами. Поэтому пренебрегать подготовкой и предколонками не следует. — *Прим. пер.*

² К. К. Unger, *Porous Silica*, Elsevier, Amsterdam, 1979; J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A*, **779**, 29 (1997).

- в) ассоциированные силанолы (вицинальные), присоединенные к соседним атомам, не являются кислотами. На них стремятся адсорбироваться соединения с ОН-группами;
- г) силанолы по соседству с катионами металлов являются сильными кислотами. Они повышают разнородность поверхности и могут отрицательно влиять на разделение основных соединений;
- д) силоксаны — это продукт конденсации сопряженных силанолов. Нагрев силикагеля увеличивает количество силоксанов и снижает концентрацию силанолов.

Силикагель можно получить несколькими способами, например полным гидролизом силиката натрия или поликонденсацией эмульгированного полиэтоксисилоксана с последующей дегидратацией. В зависимости от способа получения образуются частицы неправильной или сферической формы. Кроме того, свойства конечного продукта зависят от условий реакции (рН, концентрации, добавок, даже скорости перемешивания и размера емкости). Одним из наиболее важных показателей является содержание металлов в исходных веществах, так как это определит концентрацию кислых силанолов. «Приемлемыми» считаются силикагели, содержащие не более 250 м.д. ионов натрия и до 150 м.д. ионов алюминия, помимо других катионов, рН суспензии силикагеля может быть даже основным, в зависимости от типа и концентрации внедренных ионов. В современных силикагелях содержится не более 1 м.д. натрия, кальция, магния и алюминия и немногим больше железа. Только такие силикагели пригодны для разделения основных соединений как на прямой, так и на обращенной фазе (с химически привитыми фазами).

Сорбенты от разных производителей, помимо формы частиц (неправильной или сферической), могут различаться и по другим физическим параметрам:

- а) *диаметр пор*: должен быть больше 5 нм (50 Å). Макромолекулы должны разделяться на широкопористых материалах (30 нм = 300 Å и более);
- б) *удельная площадь поверхности*: она обратно пропорциональна диаметру пор и выражается в м²/г. Например, 100 м²/г для 30 нм сорбента, 300 м²/г для 10 нм частиц и 500 м²/г для 6 нм частиц. Чем меньше удельная площадь поверхности, тем ниже коэффициенты удерживания при прочих равных хроматографических условиях¹;
- в) *разброс по диаметру пор*: минимальный разброс — необходимое условие для получения симметричных пиков;
- г) *плотность*: плотность силикагеля равна примерно 2,2 г/см³; плотность упаковки в колонке варьирует в зависимости от производителя в пределах 0,3—0,6 г/см³.

Стабильность силикагеля ограничена диапазоном рН 1—8. Силикагели с диаметром пор до 400 нм (и размерами частиц 10 мкм) используются в эксклюзионной хроматографии. Такие стационарные фазы должны иметь строго определенный с узким разбросом диаметр пор и не обладать адсорбционными свойствами.

¹ J. R. K. Huber and F. Eisenbeiss, *J. Chromatogr.*, **149**, 127 (1978).



7.5. Химически модифицированные силикагели¹

На поверхности силикагеля имеются ОН-группы (силанольные группы), которые можно химически модифицировать, чтобы получить стационарную фазу со специфическими свойствами. Некоторые из этих реакций показаны на рис. 7.7.

I. Силанольные группы можно этерифицировать спиртами ROH, где R может быть алкильной или любой другой функциональной группой. По стерическим причинам реакция ограничивается поверхностью силикагеля (в которую, конечно, входит «внутренняя» поверхность пор) и не идет внутри твердых

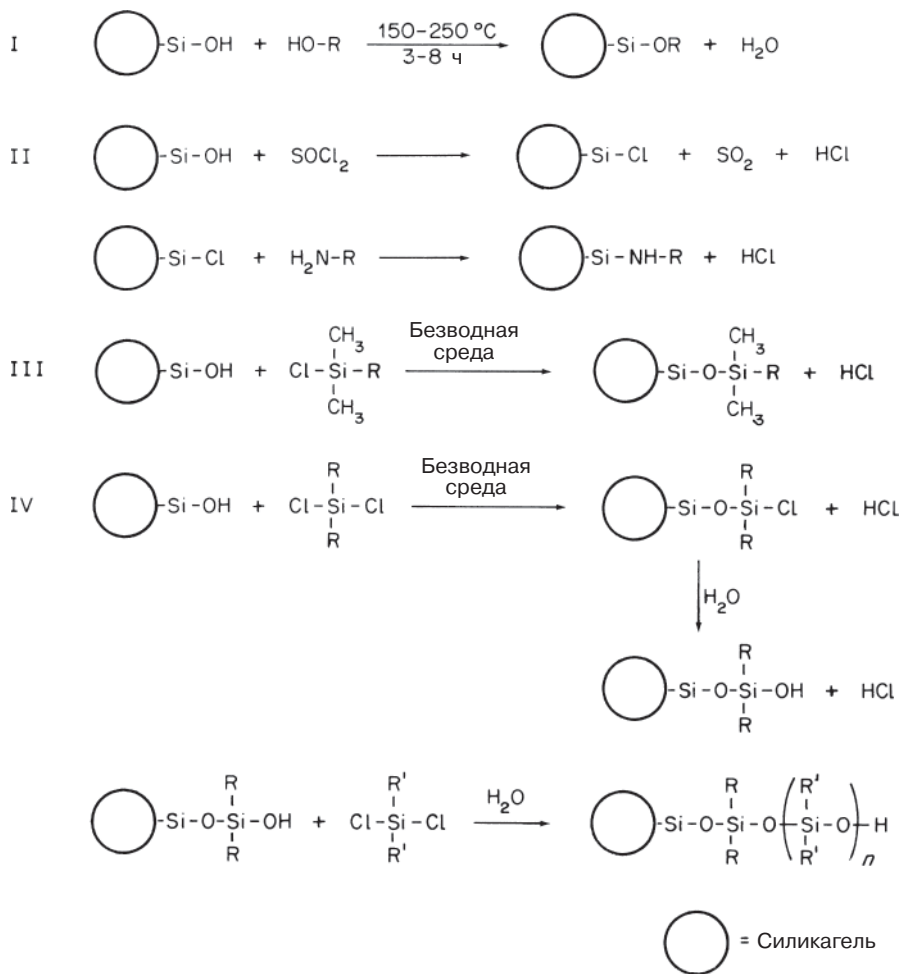


Рис. 7.7. Химическая модификация силикагеля

¹ R. P. W. Scott, *Silica Gel Bonded Phases: Their Production, Properties, and Use in LC*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 1993; B. Buszewski et al., *J. High Resolut. Chromatogr.*, **21**, 267 (1998); C. Stella et al., *Chromatographia Suppl.*, **52**, S-113 (2001).

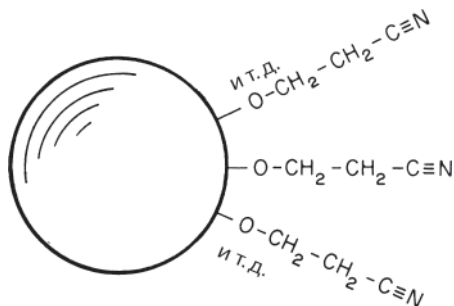


Рис. 7.8. Силикагель с щеточной поверхностью (в качестве примера приведены пропонионитрильные группы)

частиц, поэтому связанные остатки выступают на силикагеле как хвосты или «щетки» (рис. 7.8).

Этерифицированный силикагель (Si-O-C) склонен к гидролизу, и поэтому нельзя использовать подвижную фазу, содержащую воду или спирт. Более стабильна к гидролизу связь Si-C.

II. Реакция с тионилхлоридом SOCl_2 дает хлорпроизводные, которые, взаимодействуя с аминами, образуют связь Si-N. Остаток R может быть произвольным. Такие силикагели обладают лучшей гидролитической стабильностью.

III. Наиболее стабильными являются силикагели с функциональными группами, соединенными через связь Si-C (реакция с моно- или дихлорсиланами).

Силикагель с привитым остатком октадецилсилана (ОДС), в котором $\text{R} = -(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$, является наиболее широко применяемым из химически модифицированных силикагелей. Он сильно гидрофобен и является наилучшим выбором для использования в обращенно-фазовой хроматографии.

Метод получения химически связанных фаз¹: 100 мл сухого толуола + 4 г высушенного силикагеля + 2,5 мл сухого пиридина смешивают с четырехкратным количеством производного хлорсилана $\text{RSi}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ (рассчитывают на поверхность силикагеля, покрытую 2,4 группами Si-OH на 1 nm^2). Устанавливают температуру на 10° ниже температуры кипения самого летучего компонента и проводят реакцию в течение 40—150 ч (в зависимости от группы R). Время от времени смесь осторожно перемешивают. В конце реакции гель фильтруют, промывают и сушат.

Последующая обработка триметилхлорсиланом, известная как *эндкепирование*, снижает число силанольных групп, которые не прореагировали из-за стерических затруднений.

IV. Подобные реакции (рис. 7.7) образуют полимерные структуры (не щеточного типа), представляющие собой не что иное, как кремнийорганические смолы или полисилоксаны. Можно выбрать любую степень плотности сшивки полимера. Известны разнообразные методы синтеза². Весьма эффективным является полное покрытие силикагелевого скелета полимерным слоем, обеспе-

¹ G. E. Berendsen, K. A. Pikaart and L. de Galan, *J. Liq. Chromatogr.*, **3**, 1437 (1980).

² M. Petro and D. Berek, *Chromatographia*, **37**, 549 (1993).



Таблица 7.1. Функциональные группы в химически модифицированных силикагелях

Группа	Формула	Группа	Формула
Триакоңтил ¹	$-(CH_2)_{29}CH_3$	Амино	$-NH_2$
Докозил	$-(CH_2)_{21}CH_3$	Нитро	$-NO_2$
Октадецил	$-(CH_2)_{17}CH_3$	Нитрил (циано)	$-C\equiv N$
Октил	$-(CH_2)_7CH_3$	Оксипропионитрил	$-OCH_2CH_2C\equiv N$
Гексил	$-(CH_2)_5CH_3$	виц-гидроксилы (диолы)	$-CH_2(OH)CH_2(OH)$
Триметил	$-Si(CH_3)_3$	Фторалкил ³	$-(CF_2)_nCF_3$
Алкилкарбамат ²	$-CO(CO)NH-(CH_2)_nCH_3$	Поликапролакта́м (полиамид, нейлон)	$-[NH(CH_2)_5C=O]_n-$
Циклогексил	$-C_6H_{11}$		
Фенил	$-C_6H_5$		
Дифенил	$-(C_6H_5)_2$		
Диметиламино	$-N(CH_3)_2$		

чивающим достаточно хорошую устойчивость сорбента к высоким и низким значениям pH.

Используемые функциональные группы перечислены в табл. 7.1^{1,2,3}. К силикагелю можно привить функциональные группы, пригодные для ионообменной, аффинной хроматографии или для разделения энантиомеров. Выбор фаз специального назначения для разделения биополимеров огромен (рис. 7.9).

Химическая стабильность пришитых фаз⁴

При высоком pH растворяется силикагельный скелет. Низкий pH приводит к гидролизу силоксановой связи: $SiO-Si-R \rightarrow Si-OH + HO-Si-R$. Быстрее всех подвергаются атаке небольшие эндкепированные группы. Следовательно, эндкепированные фазы могут изменять свои свойства при $pH < 3$. Длинноцепочечные алкильные фазы (например, октадецил) более стабильны, чем короткоцепочечные (например, диметил).

Химическая стабильность выше у тех сорбентов, которые получены из высокочистого силикагеля с низким содержанием металлов, плотно покрыты

¹ L. C. Sander, K. E. Sharpless and M. Pursch, *J. Chromatogr. A*, **880**, 189 (2000).

² Пример стационарной фазы с «полярной включенной группой» ('polar embedded group'), которая обладает другой селективностью к полярным анализируемым соединениям по сравнению с классическими алкильными фазами (для элюентов с высоким содержанием воды). U. D. Neue et al., *Chromatographia*, **54**, 169 (2001); H. Engelhardt et al., *Chromatographia Suppl.*, **53**, S-154 (2001).

³ M. R. Euerby, A. P. McKeown and P. Petersson, *J. Sep. Sci.*, **26**, 295 (2003); M. Przybyciel, *LC GC Eur.*, **19**, 19 (2006) или *LC GC North Am.*, **23**, 554 (2005).

⁴ H. A. Claessens and M. A. van Straten, *J. Chromatogr. A*, **1060**, 23 (2004); L. Ma and P. W. Carr, *Anal. Chem.*, **79**, 4681 (2007).

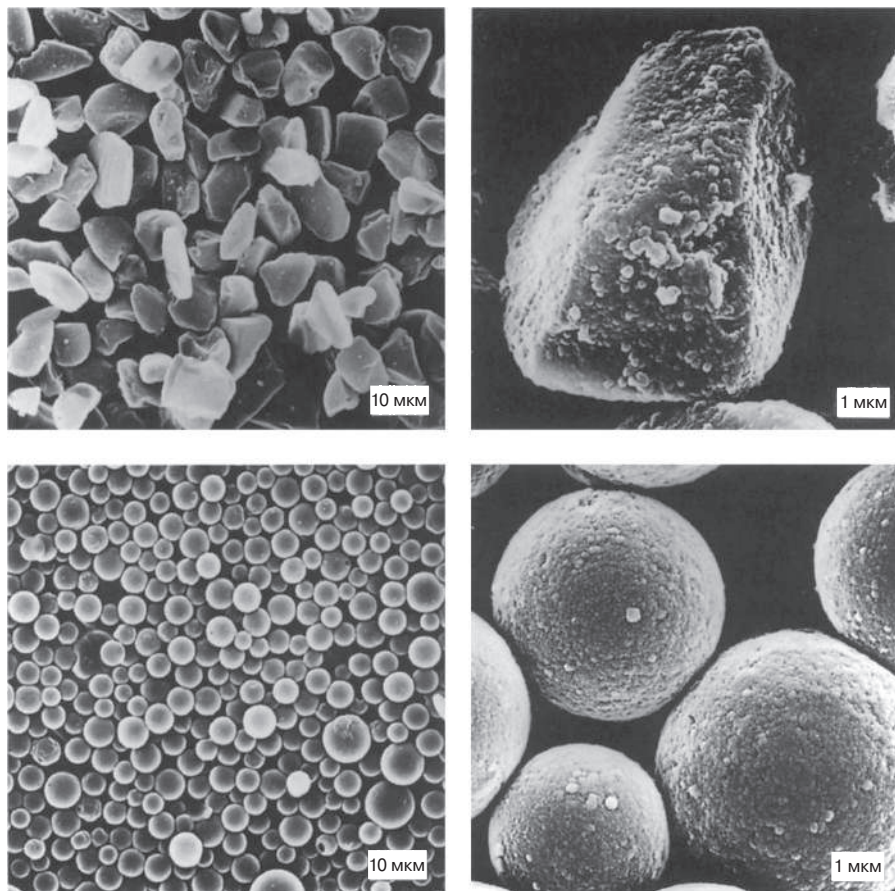


Рис. 7.9. Сорбенты ВЭЖХ неправильной и сферической формы (электронные микрофотографии, сделанные в Лаборатории электронной микроскопии Института неорганической химии, Университет Берна). Увеличение: в 700 раз (слева) и в 7000 раз (справа). Вверху: силикагель неправильной формы, средний размер частиц 5 мкм (силикагель, выпускаемый Baker). Внизу: силикагель сферической формы, средний диаметр частиц 5 мкм (Spherisorb ODS, т.е. химически модифицированный силикагель)

привитой фазой и прошли стадию эндкепирования. Выше она и для случаев, когда в качестве дериватизирующего агента использовались соединения с пространственно объемными защитными боковыми группами (рис. 7.10)¹. Продолжительность жизни колонки уменьшается при высоких температурах, высоких

¹ Не совсем так. В кислых условиях сорбенты на основе высокочистого силикагеля более стабильны, чем приготовленные из менее чистого, содержащего включения ионов металлов силикагеля. В основных условия ($\text{pH} > 9$), наоборот, менее чистый силикагель более устойчив. Менее плотная прививка (из-за стерических факторов) диизопропил- или диизобутилоктадецилсиланом дает большую устойчивость в кислых условиях и лучшую форму пиков для основных анализируемых веществ, но меньшую устойчивость в основных средах, чем более плотная прививка диметилоктадецилсиланом. — *Прим. пер.*

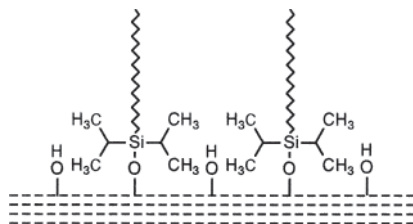


Рис. 7.10. Разветвленные боковые группы защищают привитую фазу от воздействия химических реагентов

концентрациях буферов и использовании менее пригодных буферов: неорганические буферы, такие как фосфаты или карбонаты, более агрессивны, чем органические, такие как трис или глицин.

7.6. Сополимеры стирола и дивинилбензола¹

Поперечно-сшитый полистирол представляет собой многофункциональную стационарную фазу, получаемую сополимеризацией стирола и дивинилбензола (рис. 7.11). Количество дивинилбензола, добавляемое в реакцию, определяет степень сшивки и, следовательно, пористости сорбента. Смолы с содержанием менее 6% дивинилбензола неустойчивы к давлению, и их нельзя применять в ВЭЖХ. *Полужесткие полистиролы* с 8% дивинилбензола выдерживают давление около 60 бар. Объем, занимаемый сорбентом, меняется в зависимости от растворителя и ионной силы (т. е. они набухают при низкой и сжимаются при высокой ионной силе); следовательно, выбранную изначально подвижную фазу не следует менять. *Высокоосшитые (жесткие) полистиролы* являются действительно высокоэффективными сорбентами². У них высокая степень поперечной сшивки и, следовательно, они совсем не набухают и устойчивы к давлению до 350 бар.

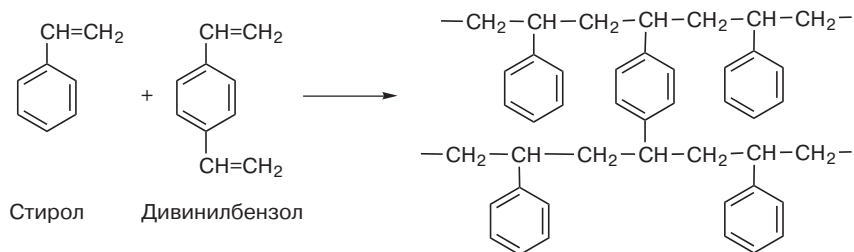


Рис. 7.11. Стиролдивинилбензолный полимер

¹ H. W. Stuurman, J. Köhler, S. O. Jansson and A. Litzen, *Chromatographia*, **23**, 341 (1987); L. L. Lloyd, *J. Chromatogr.*, **544**, 201 (1991).

² В том смысле, что выдерживают высокие давления. — *Прим. пер.*

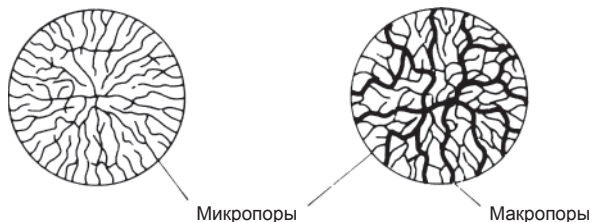
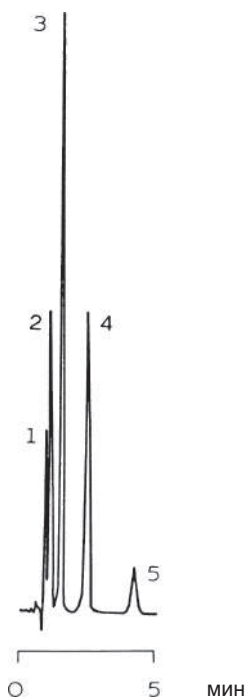


Рис. 7.12. Пористая структура стиролдивинилбензольной матрицы

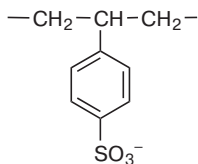
Стиролдивинилбензольные фазы могут быть только микропористыми или содержать смесь микро- и макропор (рис. 7.12). Присутствие макропор диаметром несколько десятков нанометров облегчает доступ более крупных молекул к активным центрам.



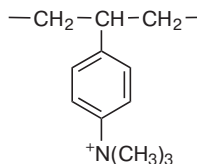
В отличие от силикагеля, стиролдивинилбензольные матрицы устойчивы к изменениям pH в пределах 1—13. Стиролдивинилбензол в сочетании с водной подвижной фазой можно использовать как обращенную фазу. Отличная устойчивость к высоким и низким pH расширяет границы при выборе наилучшего состава элюента, что является преимуществом перед стационарными фазами на основе силикагеля (рис. 7.13). При использовании менее полярных растворителей получают хроматографические системы нормально-фазового типа.

Ионообменники получают внедрением в матрицу соответствующих групп, как показано на рис. 7.14. Таким же способом можно привить и $C_{18}H_{37}$ -группы. Такие октадецильные фазы не содержат непрореагировавшие OH-группы, как обращенные фазы на основе силикагеля.

Рис. 7.13. Разделение хлорфенолов на стиролдивинилбензоле (воспроизведено с разрешения Hamilton). Условия: колонка 150×4,2 мм внутр. диам.; стационарная фаза PRP-1, 10 мкл; подвижная фаза — 0,1 N Na_3PO_4 (pH 12)/ацетонитрил (2:5), 2 мл/мин; УФ-детектор, 254 нм. Пики: 1 — 4-хлорфенол; 2 — 2,4-дихлорфенол; 3 — 2,4,5 и 2,4,6-трихлорфенол; 4 — 2,3,5,6-тетрахлорфенол; 5 — пентахлорфенол



Катионообменник



Анионообменник

Рис. 7.14. Ионообменные группы в смоле



Поперечная сшивка, дающая поры четко определенных размеров, делает стиролдивинилбензол чрезвычайно важной стационарной фазой в эксклюзивной хроматографии.

7.7. Другие стационарные фазы

Оксид алюминия¹

Водная суспензия окиси алюминия дает основную среду, но соответствующей обработкой можно получить нейтральные или кислые формы. Для адсорбционной хроматографии желательно использовать окись алюминия с нейтральными свойствами. Основная форма окиси алюминия является слабым катионообменником, а кислая — слабым анионообменником. Особенно эффективна окись алюминия при разделении полициклических ароматических углеводородов и структурных изомеров. В отличие от силикагеля она стабильна в диапазоне pH от 2 до 12. Окись алюминия более склонна к хемосорбции, чем силикагель, особенно при анализе кислот, что может приводить к размыванию задних фронтов пиков. Окись алюминия нельзя нагревать свыше 150 °С. Ее насыпная плотность составляет около 0,9 г/см³, плотность примерно 4,0 г/см³, а плотность при упаковке колонки 0,94 г/см³. У колонок с окисью алюминия число теоретических тарелок меньше, чем у аналогичных силикагельных колонок. Возможно получение окиси алюминия с химически привитыми производными².

Кремнекислый магний

Следует с осторожностью использовать его при очистке ароматических соединений, аминов, сложных эфиров и многих других веществ из-за возможной хемосорбции.

Сорбенты на основе стекла с контролируемым размером пор³

Получают регулируемым разделением (или, точнее, расслоением) компонентов боросиликатного стекла. При этом отделяются маленькие капельки В₂О₃, которые испаряются с поверхности силикагельной матрицы. Такой сорбент известен как стекло с контролируемым размером пор (СКП, CPG — controlled-pore glass), устойчив к давлению, обладает отличной химической стойкостью (за исключением сильных щелочей) и его можно стерилизовать. Поверхностные ОН-группы можно химически модифицировать, получая такие же разнообразные сорбенты, как и на основе силикагеля, для адсорбционной, распределительной, ионообменной, эксклюзивной и аффинной хроматографии.

¹ С. Laurent, H. A. H. Billiet and L. de Galan, *Chromatographia*, 17, 253 (1983).

² J. J. Pesek and M. T. Matyska, *J. Chromatogr. A*, **952**, 1 (2002).

³ R. Schnabel and P. Langer, *J. Chromatogr.*, **544**, 137 (1991).

Метакрилатные гели¹

Большое число ОН-групп в метакрилатных гелях (рис. 7.15) придает им большую полярность. В неизменном виде метакрилатные гели можно использовать для гель-фильтрации, а в модифицированном виде — в аффинной хроматографии. Гидроксисилановые остатки можно получить из гликоля или глицерина.

Гидроксиапатит²

Представляют собой гексагональные кристаллы фосфата кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Их можно получить в форме, устойчивой к давлению (до 150 бар) и пригодной для разделения белков и других биополимеров.

Агароза³

Агароза — это поперечно-сшитый полисахарид, стабильный в диапазоне pH 1–14. Из него можно получить производные, например стационарные фазы для аффинной хроматографии.

Пористый графитированный углерод⁴

Пористый графитированный углерод (ПГУ) является полностью пористой стационарной фазой из сферических частиц с уникальными обращенно-фазовыми свойствами, хотя может также использоваться в нормально-

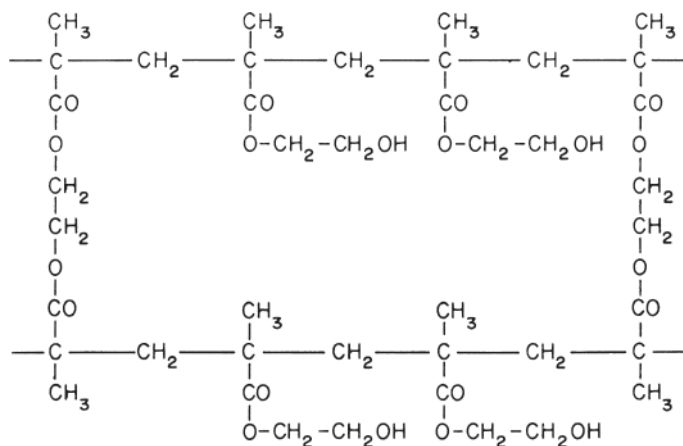


Рис. 7.15. Структура гидроксисиланметакрилатного геля

¹ M. J. Beneš, D. Horák and F. Svec, *J. Sep. Sci.*, **28**, 1855 (2005).

² T. Kawasaki, *J. Chromatogr.*, **544**, 147 (1991); S. Doonan, *Methods Mol. Biol. (Totowa)*, **59**, 211 (1996).

³ S. Hjerten, in: *HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, M. T. W. Hearn (ed.), VCH, New York, 1991, pp. 119–148.

⁴ P. Ross and J. H. Knox, *Adv. Chromatogr.*, **37**, 121 (1997).

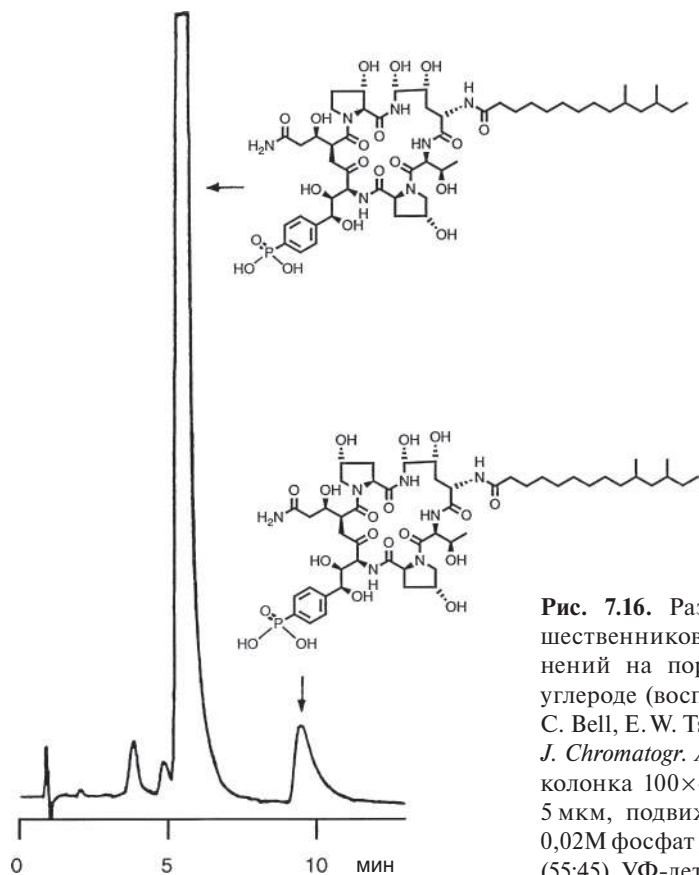


Рис. 7.16. Разделение изомеров предшественников лекарственных соединений на пористом графитированном угле (воспроизведено с разрешения С. Bell, E. W. Tsai, D. P. Ip and D. J. Mathre, *J. Chromatogr. A*, **675**, 248, 1994). Условия: колонка 100×4,6 мм, сорбент Hypercarb 5 мкм, подвижная фаза — 1,5 мл/мин, 0,02М фосфат калия pH 6,8/ацетонитрил (55:45). УФ-детектор, 220 нм

фазовом разделении. У ПГУ кристаллическая графитовая поверхность. Он химически устойчив в средах от 10 М кислоты до 10 М щелочи и может выдерживать высокие температуры. Селективность (или порядок элюции) отличается от обращенных фаз на основе силикагеля. Рекомендуются использовать ПГУ для разделения сильнополярных и ионизированных соединений, а также стереоизомеров. Пригоден для больших, достаточно жестких молекул с множеством полярных групп, каковыми являются многие природные и синтезированные лекарственные соединения. На рис. 7.16 показано разделение двух изомеров предшественника лекарственного соединения с общей формулой $C_{50}H_{80}N_8O_{20}PK$.

Оксид титана

Оксид титана — кристаллический TiO_2 , на поверхности которого находятся основные ОН-группы (в отличие от силикагеля), и поэтому он устойчив к высоким pH. Его можно использовать как для нормально-фазового, так и для обращенно-фазового разделения.

Оксид циркония¹

Оксид циркония ZrO_2 обладает теми же свойствами, что и оксид титана, но может еще взаимодействовать с анализируемым соединением посредством лигандного обмена, так как является кислотой Льюиса. Можно получить химические производные. Покрытие полибутадиеном или полистиролом дает фазы, устойчивые к диапазону pH по меньшей мере от 1 до 13 и к температурам выше 200 °C.

Фазы с ограниченным доступом к поверхности²

Этот особый тип стационарных фаз разработан для анализа лекарств и их метаболитов в сыворотке крови (и других жидкостях организма). При соответствующем подборе pH и ионной силы подвижной фазы белки не задерживаются, а небольшие умеренно-полярные молекулы хорошо разделяются. Поэтому сыворотку можно наносить прямо на колонку без денатурации белка, не повреждая сорбент необратимой адсорбцией. Пример такого типа стационарной фазы показан на рис. 7.17. Ширина пор достаточно мала, чтобы предотвратить проникновение белков внутрь частицы (это похоже на принцип эксклюзионной

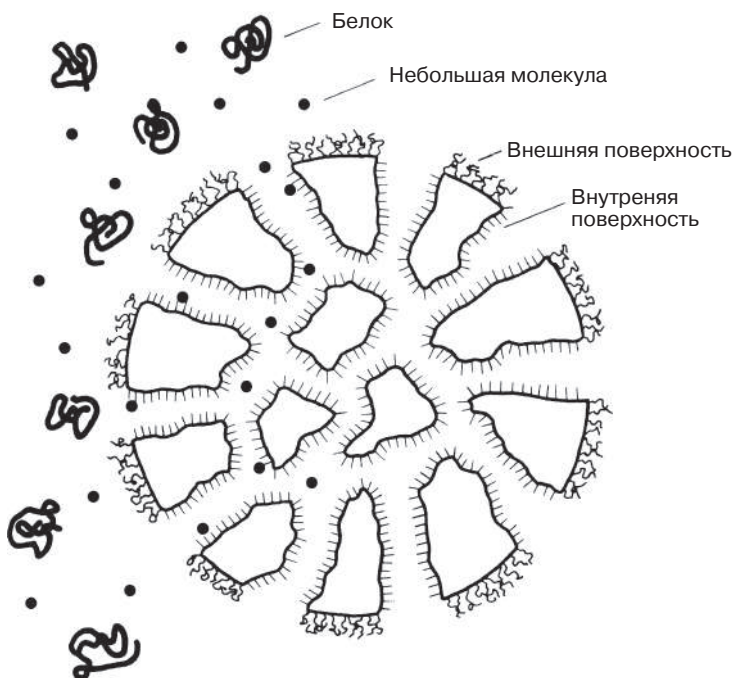


Рис. 7.17. Фаза с ограниченно-доступной поверхностью

¹ C.J. Dunlap, C. V. McNeff, D. Stoll and P.W. Carr, *Anal. Chem.*, **73**, 599A (2001).

² K. S. Boos and A. Rudolphi, *LC GC Int.*, **11**, 84 and 224 (1998).



хроматографии, см. главу 15). Кроме того, внешняя поверхность не адсорбирует и не вызывает денатурацию. А та фаза, которая отвечает за разделение небольших молекул образца, находится на внутренней поверхности пор.

7.8. Хранение и регенерация колонки

Если колонка не используется, ее следует заполнить растворителем, герметично укупорить и не трясти. Вода считается непригодной для консервации главным образом потому, что она является потенциальной средой для грибкового роста. Солевые растворы (буферы) могут кристаллизоваться и забивать колонку.

Не забывайте указывать на ярлыке тип подвижной фазы в колонке.

После длительного периода использования или без должной профилактики колонки могут загрязняться накапливающимися адсорбируемыми веществами, особенно в верхней области сорбента, ухудшая полное разделение. Прежде чем заменить колонку, можно попытаться ее регенерировать (хотя и без гарантии на успех!). Предколонки необходимо отсоединять перед такими манипуляциями. В таких случаях неплохо менять направление потока через колонку¹.

Силикагелевые колонки

Следующие растворители последовательно прогоняются через колонку со скоростью 1—3 мл/мин:

75 мл тетрагидрофурана;

75 мл метанола;

75 мл 1—5 % раствора уксусной кислоты, если загрязнения щелочные;

75 мл 1—5 % пиридина, если загрязнения кислые;

75 мл тетрагидрофурана;

75 мл *трет*-бутилового эфира;

75 % гексана (если гексан в последующем используется для хроматографии, в ином случае остановиться на эфире).

Если разделение ухудшается из-за адсорбции на силикагеле большого количества воды, последнюю можно удалить химическим способом²: либо реагентами, изготовленными собственноручно, либо приобретенными и готовыми к употреблению (Alltech Associates, Deerfield Illinois, USA)

Октадецильные, октильные, фенильные и нитрильные колонки³

Следующие растворители необходимо последовательно пропустить через колонку со скоростью 0,5—2,0 мл/мин:

75 мл воды + нанесение 4×100 мкл диметилсульфоксида;

75 мл метанола;

¹ Перед тем как менять направление потока в колонке, необходимо свериться с ее паспортом и удостовериться в том, что на этой колонке можно менять направление потока. — *Прим. пер.*

² R. A. Bredeweg, L. D. Rothman and C. D. Pfeiffer, *Anal. Chem.*, **51**, 2061 (1979).

³ R. E. Majors, *LC GC Eur.*, 16, 404 (2003) или *LC GC North Am.*, **21**, 19 (2003).

75 мл хлороформа;

75 мл метанола;

Вода → 0,1 М серная кислота → вода.

Если колонка частично потеряла химически связанную фазу, можно попробовать привить ее повторно, используя для этого силаны¹.

Анионообменные колонки

Необходимо промыть колонку последовательно следующими растворителями со скоростью 0,5—2,0 мл/мин:

75 мл воды;

75 мл метанола;

75 мл хлороформа;

Метанол → вода.

Катионообменные колонки

Последовательно используют следующие растворители со скоростью 0,5—2,0 мл/мин:

75 мл воды + нанесение 4×200 мкл диметилсульфоксида;

75 мл тетрагидрофурана;

Вода.

Так же анионо- и катионообменники хорошо промывать следующим образом:

75 мл воды;

75 мл 0,1—0,5 М раствора буфера, который использовался ранее (для увеличения ионной силы);

75 мл воды;

75 мл 0,1 М серной кислоты;

75 мл воды;

75 мл ацетона;

75 мл воды;

75 мл 0,1 М натриевой соли ЭДТА;

75 мл воды.

Через катионообменники на основе стиролдивинилбензола прокачивают 0,2 N гидроксид натрия при 70 °C всю ночь (для удаления бактерий², которые могут присутствовать на поверхности частиц).

Стиролдивинилбензолные колонки

Промывать колонку подвижной фазой необходимо со скоростью 0,5—2,0 мл/мин в следующей последовательности:

40 мл толуола или свободным от перекисей (менее 50 м.д.) тетрагидрофураном;

¹ С. Т. Mant and R. S. Hodges, *J. Chromatogr.*, **409**, 155 (1987).

² Если вы до этого прокачивали ацетон, то все бактерии давно приказали долго жить, но если вы испытываете к бактериям личную неприязнь, то, конечно, можете умертвить их повторно щелочью. — *Прим. пер.*

200 мл 1 % меркаптоуксусной кислоты в тетрагидрофуране или толуоле; если колонка забита стиролбутадиеновым каучуком либо природным или синтетическим каучуком.

Для колонок, используемых для разделения биополимеров, рекомендуются специальные методики регенерации¹.

Заполнение сорбентом

Колонку можно вскрывать для осмотра слоя сорбента². Если слой поврежден (рис. 7.18а), колонку восстанавливают следующим способом: (А) нарушенный слой удаляют тонким шпателем и разравнивают; (Б) мертвый объем заполняют стеклянными бусинами размером примерно 35 мкм или соответствующим пористым сорбентом, а колонку вновь плотно закрывают. Фильтр заменяют новым³.

Колонки, упакованные 3-мкм частицами, обычно снабжают разными фильтрами, например на входе — с размером пор 2 мкм, на выходе — 0,5 мкм.

Безусловно, при соблюдении мер предосторожности (гашение пульсаций насоса, правильная подготовка подвижной фазы и образца, предотвращение осаждения веществ внутри колонки и т. д.) необходимость в восстановительных работах может не возникнуть. По данному вопросу имеются превосходные статьи Рэйбела и Наджента с Доланом⁴.

Пустоты, образованные при разрушении упакованного сорбента в картридже с аксиальным сжатием хроматографического слоя, можно удалить простым затягиванием концевых фитингов.

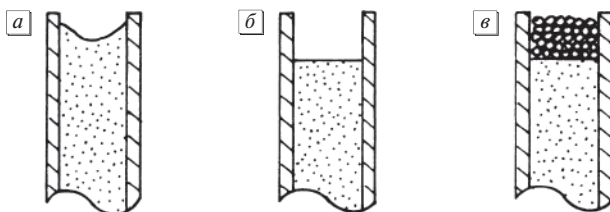


Рис. 7.18. Восстановление колонки с разрушенным слоем сорбента

Удаление сорбента из колонки

Содержимое колонки не следует удалять шпателем, проволокой и др., иначе можно поцарапать внутренние стенки и повредить сам сорбент. Наилучший способ — это удалить фильтр и фитинги на выходе и насосом выдавить содержимое.

¹ С. Т. Wehr and R. E. Majors, *LC GC Int.*, **1** (4), 10 (1988) или *LC GC Mag.*, **5**, 942 (1987).

² Современные ВЭЖХ-колонки лучше не вскрывать. Их легко испортить совсем. —

Прим. пер.

³ J. W. Dolan, *LC GC Int.*, **6**, 736 (1993).

⁴ R. M. Rabel, *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 394 (1980); K. D. Nugent and J. W. Dolan, *J. Chromatogr.*, **544**, 3 (1991).

Направление потока

Лучше всего использовать ВЭЖХ-колонку всегда в одном направлении либо надо знать, почему направление потока было изменено. На многих колонках имеется стрелка, указывающая направление. В таком случае бывает неясно, можно ли изменить направление потока. Если фильтры на обоих концах колонки одинаковы по пористости, то нет никаких технических препятствий для использования колонки в обратном направлении. Но фильтры могут различаться по диаметру пор, а более широкопористый должен быть на входе в колонку. В этих условиях не рекомендуется менять направление потока. Если на колонке не имеется стрелки, рекомендуется обозначить ее самим и затем всегда использовать ее в одном направлении. Тогда мелкие частицы и сильно удерживаемые соединения концентрируются на входе. Направление потока меняют только с целью регенерации колонки.

ГЛАВА 8

ТЕСТИРОВАНИЕ ВЭЖХ-КОЛОНОК

8.1. Простое тестирование ВЭЖХ-колонок

Любые только что упакованные или вновь приобретенные колонки следует тут же проверять, хотя бы с помощью тех несложных тестов, которые приведены в данном разделе. Любое подозрение на снижение числа теоретических тарелок, увеличивающееся размывание заднего¹ фронта пиков или недостаточную про- ницаемость колонки должно проверяться соответствующими тестами.

Число теоретических тарелок

Пример их расчета приводится в разделе 2.3.

В качестве тестовых соединений обычно берутся вещества, которые в определенной хроматографической системе дают пики симметричной формы (раздел 8.4). По числу теоретических тарелок для неударживаемого или слабо ударживаемого компонента можно судить о качестве упаковки или величине внеколоночного объема. На поздно элюируемый пик будут влиять еще и эффекты, связанные с массопереносом. Если число теоретических тарелок у последнего пика будет намного меньше, чем у неударживаемого, то это признак затруднительного массопереноса, и хроматографическая система непригодна для разделения рассматриваемой смеси. Если же оно намного выше, то это может указывать на чересчур большой внеколоночный объем системы.

Число теоретических тарелок часто используется для качественной характеристики колонки, но не следует переоценивать его значение. Утверждение «у моей колонки 10 000 теоретических тарелок» должно сопровождаться сведениями о:

- а) длине и внутреннем диаметре колонки;
- б) компоненте образца и его коэффициенте ударживания;
- в) подвижной и стационарной фазах;
- г) скорости потока подвижной фазы;
- д) количестве образца;
- е) строго говоря, о рабочей температуре.

Число теоретических тарелок должно определяться только в изократических условиях! Градиент будет сжимать пики.

¹ Имеет смысл говорить о любых изменениях формы пика, у которого может размываться не только задний, но и передний фронт, а кроме того, пик может и расщепляться. — *Прим. пер.*

Симметрия пиков

Ее расчет приводится в разделе 2.7.

Колонку можно протестировать на симметрию пиков кислот и оснований, включив соответствующие соединения (фенолы, амины) в тестовую смесь. Отчетливое уширение заднего фронта в том или другом случае покажет, что колонка непригодна для данного типа анализируемого соединения¹.

Проницаемость

Значение проницаемости K колонки свидетельствует о качестве упаковки, а также о любой закупорке в системе, как, например, засоренные фильтры или капилляры. K вычисляется по формуле:

$$K = \frac{uL_c}{\Delta p},$$

$$u = \frac{L_c}{t_0},$$

$$K = \frac{L_c^2}{\Delta p t_0} \left(\frac{\text{мм}^2}{\text{с} \cdot \text{бар}} \right),$$

где u — линейная скорость потока подвижной фазы ($\text{мм}/\text{с}^{-1}$), L_c — длина колонки (мм) и Δp — перепад давлений на колонке (бар).

Если значение K слишком большое, то это значит, что колонка плохо упакована². Слишком малое значение K указывает на засорение.

Удельная проницаемость K° , кроме u , L_c и Δp , связана еще с вязкостью растворителя η и общей пористостью колонки ϵ :

$$K^\circ = \frac{u\eta L_c \epsilon}{\Delta p} = K\eta\epsilon,$$

$$K^\circ = 10^{-8} K\eta\epsilon \text{ (мм}^2\text{)}.$$

При выражении η через $\text{мПа} \cdot \text{с}$ значение ϵ составляет 0,8 для силикагеля, около 0,65 для химически связанных фаз на основе силикагеля и около 0,4 для непористых сорбентов.

Если u выразить через $4F/d_c^2\pi\epsilon$, то, используя более удобные параметры, можно вычислить K° по формуле:

$$K^\circ = \frac{4F\eta L_c}{d_c^2\pi\Delta p},$$

$$K^\circ = 21 \cdot 10^{-8} \frac{F\eta L_c}{d_c^2\Delta p} \text{ (мм}^2\text{)},$$

где F — объемная скорость потока подвижной фазы ($\text{мл}/\text{мин}$), определяемая с помощью мерной пробирки и секундомера, а d_c — внутренний диаметр колонки (мм).

¹ Строго говоря, это говорит лишь о том, что в этих условиях анализировать данные соединения нельзя. — *Прим. пер.*

² Это говорит о хорошей проницаемости колонки. — *Прим. пер.*



Задача 18

Колонка размером $250 \times 3,2$ мм заполнена силикагелем с 5-мкм частицами. Давление для элюента с вязкостью $0,33$ мПа·с (гексан) равно 70 бар. Время проскока 60 с. Рассчитать значения K и K° .

Решение

$$K = \frac{L_c^2}{\Delta p t_0} = \frac{250^2}{70 \cdot 60} \frac{\text{мм}^2}{\text{с} \cdot \text{бар}} = 15 \frac{\text{мм}^2}{\text{с} \cdot \text{бар}}$$

$\varepsilon = 0,8$ (силикагель)

$$K^\circ = K \eta \varepsilon = 10^{-8} \cdot 15 \cdot 0,33 \cdot 0,8 \text{ мм}^2 = 4,0 \cdot 10^{-8} \text{ мм}^2$$

или:

$$K^\circ = 21 \cdot 10^{-8} \frac{F \eta L_c}{d_c^2 \Delta p} = 21 \cdot 10^{-8} \frac{1,6 \cdot 0,33 \cdot 250}{3,2^2 \cdot 70} \text{ мм}^2 = 3,9 \cdot 10^{-8} \text{ мм}^2$$

при скорости потока $1,6$ мл/мин.

Рассчитанное число теоретических тарелок и перепад давления на колонке можно сравнить со значениями, приблизительно определенными по рис. 2.29 и 2.30. 5- или 10-кратное их расхождение должно настораживать (колонку необходимо тестировать в условиях, близких к Ван-Деемтеровскому минимуму).

8.2. Определение размера частиц

Диаметр частиц d_p в колонке может быть или вовсе неизвестен, или информация о нем утеряна. В этом случае можно распаковать колонку и измерить d_p под микроскопом. Другим способом является использование уравнения Козе-ни – Кармана:

$$K^\circ \approx \frac{d_p^2}{1000}.$$

Отсюда можно вычислить диаметр частиц:

$$d_p \approx \sqrt{1000 K^\circ}.$$

Коэффициент 1000 применим для всех типов сорбентов из частиц при условии хорошей их упаковки и отсутствия засорения колонки.

Задача 19

В задаче 18 вычислена удельная проницаемость, равная $4 \cdot 10^{-8} \text{ мм}^2$. К какому диаметру частиц относится данная K° ?

Решение

$$4 \cdot 10^{-8} \text{ мм}^2 = 4 \cdot 10^{-2} \text{ мкм}^2,$$

$$d_p = \sqrt{1000 K^\circ} = \sqrt{4 \cdot 10^{-2} \cdot 10^3} = \sqrt{40} = 6,3 \text{ мкм.}$$

По сведениям производителя колонки, средний размер частиц составляет примерно 5 мкм (у силикагеля со сферическими частицами).

8.3. Определение времени проскока

Линейная скорость подвижной фазы u нужна для расчета проницаемости. Информация о теоретических тарелках не будет правильной без знания значения u , поскольку высота теоретической тарелки зависит от скорости потока (см. рис. 2.7). Рассчитывают u следующим образом:

$$u = \frac{L_c}{t_0}.$$

Примечание: $u \neq 4F/d_c^2\pi$, так как сама стационарная фаза занимает определенный объем колонки. Истинным равенством является $u = 4F/d_c^2\pi\epsilon$ или при $\epsilon = 0,65$:

$$u \text{ (мм/с)} = 33 \frac{F \text{ (мл/мин)}}{d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)}}.$$

Следовательно, для вычисления u необходимо определить время проскока t_0 (оно также необходимо для расчета коэффициента удерживания k). Его можно определить, измеряя время удерживания первого пика на хроматограмме. Вопрос в том, перемещается ли этот пик точно со скоростью подвижной фазы. Даже слабейшее удерживание этого первого пика сильно завышает время проскока. Соединения, которые не проникают во весь объем пор (что не редкость в обращенно-фазовой хроматографии, особенно при высоком содержании воды в подвижной фазе), первыми фиксируются детекторами и «симулируют» чересчур заниженное время проскока¹.

Пористость может быть использована для проверки времени проскока. Общая пористость колонки ϵ — это объемная доля, занимаемая подвижной фазой:

$$\epsilon = \frac{V_{\text{колонки}} - V_{\text{упаковоч. материала}}}{V_{\text{колонки}}}.$$

ϵ проще всего определить по уравнению:

$$\epsilon = \frac{4Ft_0}{d_c^2\pi L_c} = 21 \frac{F \text{ (мл/мин)} t_0 \text{ (с)}}{d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)} L_c \text{ (мм)}},$$

где F — объемная скорость потока подвижной фазы, t_0 — время проскока, d_c — внутренний диаметр колонки, а L_c — длина колонки. У силикагеля $\epsilon \approx 0,7\text{--}0,8$, у сорбентов с привитыми фазами ϵ около $0,6\text{--}0,7$ и у непористых частиц приблизительно $0,4$.

¹ Проблемы, связанные с определением времени проскока, были рассмотрены C.A. Rimmer, C.R. Simmons and J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A*, **965**, 219 (2002).



Проверка времени проскока

Если у колонок, упакованных сорбентом с привитой фазой (например, C_{18}), ϵ будет равно 0,65, то полученное время проскока будет правильным¹. Если $\epsilon > 1$, то анализируемое соединение не перемещается со скоростью подвижной фазы, а удерживается стационарной фазой и элюируется позже. Если $\epsilon < 0,5$, вещество не попадает во весь объем пор стационарной фазы (как в эксклюзионной хроматографии) и покидает колонку раньше времени проскока.

В двух последних случаях используемое тестовое вещество непригодно для определения времени проскока.

Аналогичная диагностика подходит для силикагельных или непористых частиц, граничные значения ϵ которых будут 0,75 или 0,4, соответственно.

Задача 20

Рассчитайте общую пористость колонки $150 \times 4,6$ мм, у которой время проскока составляет 67 с при скорости потока 1,4 мл/мин.

Решение

$$\epsilon = \frac{4Ft_0}{\pi d_c^2 L_c} = 21 \frac{1,4 \cdot 67}{4,6^2 \cdot 250} = 0,62.$$

При этом если известно ϵ , то можно рассчитать t_0 . Если принять, что пористость равна 0,65 (привитая фаза), то можно вывести следующее уравнение:

$$t_0 (\text{с}) = 0,03 \frac{d_c^2 (\text{мм}^2) L_c (\text{мм})}{F (\text{мл/мин})}.$$

Задача 21

Определите время проскока исходя из данных, приведенных в задаче 20 (для привитой фазы).

Решение

$$t_0 (\text{с}) = 0,03 \frac{d_c^2 (\text{мм}^2) L_c (\text{мм})}{F (\text{мл/мин})} = 0,03 \frac{4,6^2 \cdot 150}{1,4} = 68 \text{ с}.$$

Рассчитанное по этому способу время проскока можно подтвердить, если в этом месте на хроматограмме наблюдается флуктуация базовой линии или какой-либо пик. Существует также быстрый способ определения времени проскока у колонок диаметром 4,6 мм при скорости потока 1 мл/мин: $t_0 (\text{мин}) \approx 0,1 L_c (\text{см})$ или $V_0 (\text{мл}) \approx 0,1 L_c (\text{см})$.

¹ То есть необходимо подставить значение времени удерживания неудерживаемого компонента в формулу для вычисления ϵ . Если мы получим значение ϵ около 0,65, то мы правильно определили время проскока. — *Прим. пер.*

8.4. Тестовая смесь

При анализе специфических соединений можно использовать специфическую тестовую смесь, например смесь афлатоксинов при определении афлатоксинов. (Однако для определения числа теоретических тарелок тестовая смесь не должна включать какие-либо пептиды или белки¹. Эти соединения *требуют* элюирования в градиентном режиме см. рис. 18.7), тогда как число тарелок рассчитывается по изократической хроматограмме.) Во всех остальных случаях тестовая смесь должна удовлетворять следующим условиям:

- а) качественная и доступная;
- б) стабильная;
- в) не слишком токсичная;
- г) давать симметричные пики;
- д) хорошо поглощать в УФ, или, в более общем случае, хорошо детектироваться.

Так как колонку нельзя перегружать, необходимо наносить не более 1 мкг каждого компонента на 1 г стационарной фазы. Допустимое для аналитических колонок количество настолько мало, что делает детекцию по коэффициенту преломления рискованной или даже невозможной.

Тестовая смесь должна содержать соединение, с помощью которого можно точно измерить время проскока: оно не должно удерживаться и должно проникать во весь объем пор. Эти условия выполняются, если вещество имеет небольшую молекулярную массу и по свойствам как можно ближе к элюенту, например пентан при элюции гексаном. Пентан не поглощает в УФ, но дает небольшой пик из-за другого значения показателя преломления. Число теоретических тарелок нельзя определять по этому сигналу, поэтому рекомендуется использовать другие тестовые соединения, такие как толуол или ксилол, которые быстро элюируются ($k \approx 0,2$) и поглощают в УФ. Число теоретических тарелок низкомолекулярного или неудерживаемого соединения прямо указывает на качество упаковки и внеколоночный объем, а для поздно элюируемых пиков важны параметры массопереноса. В обращенно-фазовых системах t_0 можно определить по урацилу. Тестовая смесь также должна содержать соединения, у которых $k \approx 1$ и от 3 до 5.

Тестовая смесь для силикагельных колонок

- 0) Пентан (не удерживается, используется в качестве растворителя)
- 1) *n*-Ксилол
- 2) Нитробензол
- 3) Ацетофенон
- 4) 2,6-Динитротолуол

Подвижная фаза: смесь гексана и *трет*-бутилового эфира, позволяющая получить приемлемые значения k .

На рис. 8.1 приведена тестовая хроматограмма.

¹ В более общем случае олиго- и полимеры. — Прим. пер.

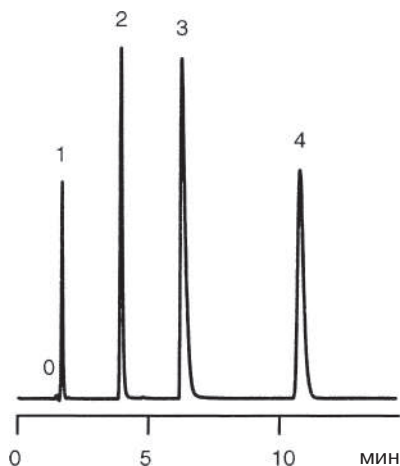


Рис. 8.1. Тестовая хроматограмма для силикагелевой колонки. Условия: колонка 250×3,2 мм; сорбент — LiChrosorb SI 60, 5 мкм; подвижная фаза — 1 мл/мин гексан-*трет*-бутиловый эфир (95:5); детектор — УФ 254 нм. Пики: 0 — пентан, 1 — *n*-ксилол, 2 — нитробензол, 3 — ацетофенон, 4 — 2,6-динитротолуол

Тестовая смесь для обращенно-фазовых колонок

0) Метанол-вода или ацетонитрил-вода с составом, отличным (более слабым) от состава подвижной фазы (неудерживаемый компонент, используется в качестве растворителя)

- 1) Метил-4-гидроксibenзоат
- 2) Этил-4-гидроксibenзоат
- 3) Пропил-4-гидроксibenзоат
- 4) Бутил-4-гидроксibenзоат

Подвижная фаза: метанол-вода или ацетонитрил-вода — смесь, которая обеспечивает приемлемые значения k .

Тестовая хроматограмма приведена на рис. 8.2.

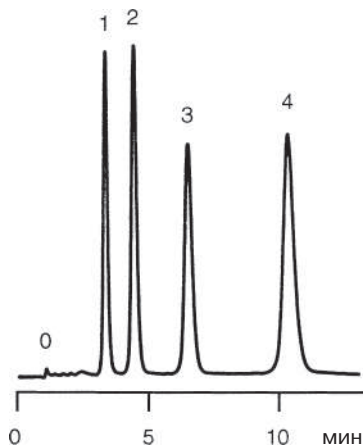


Рис. 8.2. Тестовая хроматограмма для обращенно-фазовой колонки. Условия: колонка 250×3,2 мм; сорбент — Shperisorb ODS, 5 мкм; подвижная фаза — 1 мл/мин вода-метанол (50:50); детектор — УФ 254 нм. Пики: 0 — смесь вода-метанол (метанола менее 50%), 1 — метил-4-гидроксibenзоат, 2 — этил-4-гидроксibenзоат, 3 — пропил-4-гидроксibenзоат, 4 — бутил-4-гидроксibenзоат

8.5. Безразмерные параметры, характеризующие колонку ВЭЖХ¹

Как подчеркивалось в разделе 8.1, иногда к данным о числе теоретических тарелок N или высоте тарелок H надо относиться с осторожностью. Безразмерные параметры (числа без единиц измерения) наиболее удобны для непосредственного сравнения колонок самых различных типов (длинных или коротких, толстых или тонких, нормально-фазовых или обращенно-фазовых, с крупными или микрочастицами, с разными типами сорбентов). Безразмерные величины к тому же легко запоминаются.

Первый безразмерный параметр: приведенная высота теоретической тарелки h заменяет высоту теоретической тарелки H . Значение h учитывает диаметр частиц сорбента d_p :

$$h = \frac{H}{d_p},$$

$$h = \frac{1000 L_c \text{ (мм)}}{5,54 d_p \text{ (мкм)}} \left[\frac{w_{1/2} \text{ (мм или с)}}{t_R \text{ (мм или с)}} \right]^2.$$

Второй безразмерный параметр: приведенная скорость v заменяет линейную скорость u . Значение v учитывает коэффициент диффузии D_m анализируемого вещества в подвижной фазе и диаметр частиц d_p :

$$v = \frac{d_p u}{D_m} = \frac{4 d_p F}{d_c^2 \pi \epsilon D_m},$$

$$v = 1,3 \cdot 10^{-2} \frac{d_p \text{ (мкм)} F \text{ (мл/мин)}}{\epsilon D_m \text{ (см}^2\text{/мин)} d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)}}.$$

Значение пористости ϵ для полностью пористых сорбентов примерно 0,8 (силикагель) или 0,65 (с привитой фазой). Средний коэффициент диффузии (раздел 8.7) небольших молекул в маловязких элюентах (нормальная фаза) можно принять равным $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2\text{/мин}$, а небольших молекул в сильновязких элюентах (обращенная фаза) — $6 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2\text{/мин}$. Отсюда выводится следующее уравнение:

$$\text{Нормальная фаза: } v_{NP} \approx 6,4 \frac{d_p \text{ (мкм)} F \text{ (мл/мин)}}{d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)}}.$$

$$\text{Обращенная фаза: } v_{RP} \approx 33 \frac{d_p \text{ (мкм)} F \text{ (мл/мин)}}{d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)}}.$$

Отметим, что оба уравнения верны только в вышеприведенных условиях (небольшие молекулы и пористые частицы).

¹ Темы данного и последующего разделов подробнее изложены у Р.А. Bristow and J. Н. Кнох, *Chromatographia*, **10**, 279 (1977).



Третий безразмерный параметр: безразмерное сопротивление потоку Φ заменяет проницаемость K :

$$\Phi = \frac{\Delta p d_p^2 d_c^2 \pi}{4 L_c \eta F}$$

$$\Phi = 4,7 \frac{\Delta p \text{ (бар)} d_p^2 \text{ (мкм}^2\text{)} d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)}}{L_c \text{ (мм)} \eta \text{ (мПа)} F \text{ (мл/мин)}}$$

где η — вязкость подвижной фазы. Φ связано с проницаемостью K уравнением:

$$\Phi = \frac{d_p^2}{K \eta \epsilon}$$

(см. раздел 8.1).

Четвертый безразмерный параметр: сопротивление разделению E (называемое также «эффективность»), в которое входят время удерживания, перепад давления, число теоретических тарелок, вязкость элюента и коэффициент удерживания, используют для оценки качества:

$$E = \frac{\Delta p t_0}{N^2 \eta}$$

$$E = \frac{10^8}{5,54^2} \frac{\Delta p \text{ (бар)} t_0 \text{ (с)}}{\eta \text{ (мПа} \cdot \text{с)}} \left[\frac{w_{1/2} \text{ (мм или с)}}{t_R \text{ (мм или с)}} \right]^4$$

$$E = h^2 \Phi \epsilon.$$

Чем больше значение E , тем хуже разделительная способность колонки.

Параметры h , v , Φ и E полностью характеризуют колонку. Ни один опытный хроматографист не удовлетворится только теми параметрами, которые приведены в разделе 8.1, но также включит в свои расчеты эти четыре безразмерные величины.

У хорошей колонки $h = 2-5$ (2 — это нижний предел, который означает, что полное хроматографическое уравнивание достигается уже через 2 слоя сорбента стационарной фазы; $h = 2$ создает 30 000 теоретических тарелок в 30-см колонке с частицами 5 мкм).

Оптимальная эффективность достигается при значениях v между 3 и 20.

У колонок, заполняемых суспензионным способом, Φ равен 1000 (так называемый фактор Козени — Кармана). Намного большие значения Φ (например, 2000) указывают на засорение (фильтров или капилляров, на чрезмерное повреждение сорбента). Более низкие значения говорят о некачественной упаковке с полостями и каналами.

Хорошо, когда $E < 10\,000$. Например, при $h = 3$, $\Phi = 1000$ и $\epsilon = 0,65$ для химически привитой фазы $E = 5850$. Если значение E превышает 10 000, то ВЭЖХ уже не может считаться высокоэффективным процессом.

Задача 22

Насколько хорошо упакована колонка размером 150×3 мм, у которой число теоретических тарелок составляет 4700? Стационарная фаза — C_{18} , частицы — 5 мкм.

Решение

$$h = \frac{H}{d_p} = \frac{L_c}{Nd_p},$$

$$h = \frac{150}{4700 \cdot 0,005} = 6,4.$$

Такое большое значение приведенной высоты тарелки не является нормальным для обращенно-фазовой колонки.

Задача 23

Какова рекомендуемая скорость потока для колонки из задачи 22? Подвижной фазой является вода-ацетонитрил (1:1).

Решение

Это обращенно-фазовая система.

$$v_{RP} = 33 \frac{d_p \text{ (мкм)} F \text{ (мл/мин)}}{d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)}}, \text{ должно быть равно } 3 \text{ (или чуть выше),}$$

$$F = \frac{v d_c^2}{33 d_p} = \frac{3 \cdot 3^2}{33 \cdot 5} = 0,2 \text{ мл/мин.}$$

Задача 24

Если колонку из задачи 22 элюировать метанолом со скоростью 0,5 мл/мин, то давление достигает 115 бар. Нормально ли это?

Решение

Вязкость чистого метанола составляет 0,6 мПа·с (раздел 5.1). При $\epsilon = 0,65$:

$$\Phi = 4,7 \frac{\Delta p \text{ (бар)} d_p^2 \text{ (мкм}^2\text{)} d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)}}{L_c \text{ (мм)} \eta \text{ (мПа} \cdot \text{с)} F \text{ (мл/мин)}} = 4,7 \frac{115 \cdot 5^2 \cdot 3^2}{150 \cdot 0,6 \cdot 0,5} = 2700.$$

Такое приведенное сопротивление потоку слишком велико. Засорена либо колонка, либо фильтр, либо какая-то иная часть системы.

Примечание: сопротивление разделению этой колонки слишком высоко: $E = h^2 \epsilon = 6,4^2 \cdot 2700 \cdot 0,65 = 72000!$

8.6. Уравнение Ван-Деемтера с приведенными параметрами и его использование в диагностике колонок

Эмпирическое уравнение Ван-Деемтера (раздел 2.2) с безразмерными величинами можно записать так:

$$h = Av^{0,33} + \frac{B}{v} + Cv,$$

где A — коэффициент, характеризующий вихревую диффузию и распределение потока, B — продольную диффузию, а C — массоперенос. Это модифицированное уравнение Ван-Деемтера, известное как уравнение Нокса.

A , B и C являются постоянными: $A = 1$, $B = 2$, а $C = 0,1$ для хороших (не самых лучших) колонок¹, уравнение Ван-Деемтера можно записать (см. рис. 8.3) как:

$$h = v^{0,33} + \frac{2}{v} + 0,1v.$$

A зависит от качества упаковки (а также от k) и больше 2 (вплоть до 5) у плохо упакованных колонок. B зависит только от коэффициента диффузии образца. C зависит от сорбента, вернее, от его способности к массопереносу². Следовательно, причину плохого разделения колонки с небольшим числом теоретических тарелок, скорее всего, можно найти, если известны A и C . Тем не менее A , B и C нельзя рассчитать вообще, пока целый ряд значений пары $h(v)$ не определен с достаточной точностью. Таким образом, кривая $h(v)$ гораздо больше подходит для качественной оценки:

а) если h_{\min} меньше 3^3 при $v = 3-5$, то колонка упакована хорошо. Однако если h_{\min} превышает 10 при тех же значениях v , то колонка упакована плохо;

б) если значение h меньше 10 при $v = 100$, то сорбент обладает малым сопротивлением массопереносу (C имеет небольшое значение); колонка в этом случае также неплохо набита;

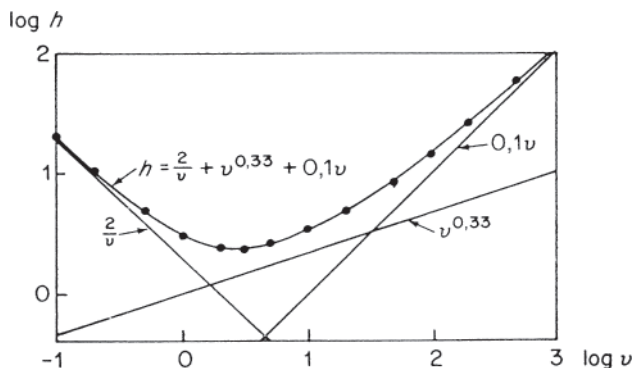


Рис. 8.3. Кривая Ван-Деемтера с приведенными параметрами (печатается с разрешения Vieweg Publishing из P. A. Bristow and J. H. Knox, *Chromatographia*, **10**, 282 1977). Форма и положение кривой не зависят от диаметра частиц сорбента

¹ У самых хороших массоперенос C составляет 0,05 или меньше.

² На самом деле, как это показано в недавней работе F. Gritti, G. Guiochon, Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency, *Journal of Chromatography A*, **1221** (2012), все три параметра A , B , C , помимо всего прочего, зависят от k . — Прим. пер.

³ Самые лучшие современные колонки имеют $h = 1$. — Прим. пер.

в) если кривая резко поднимается справа, то значение S велико и сорбент обладает большим сопротивлением массопереносу (крутой наклон может быть также вызван инструментальными особенностями системы);

г) если минимум находится в области больших значений h и не ярко выражен, то колонка набита плохо, а значение A велико.

Такие сведения нельзя получить по кривой $H(u)$, так как ее расположение зависит от диаметра частиц и коэффициента диффузии.

Если оценка всей кривой $h(v)$ требует слишком много времени, то даже одна пара значений может обеспечить достаточной информацией:

при $v = 3$ h не должен быть выше 3–4;

при $v = 100$ h не должен превышать 10–20;

при $v \approx 3$ слишком высокое h указывает на то, что сорбент плохо упакован;

при $v = 20–100$ и слишком большом значении h можно предполагать, что есть проблемы с массопереносом или качеством упаковки и следует определить несколько соседних точек, чтобы обнаружить одно из двух: небольшой подъем, свидетельствующий о некачественной набивке, или крутой подъем, указывающий на большое сопротивление массопереносу.

При приведенной скорости потока около 3 находится минимум кривой. Как было упомянуто в разделах 2.2 и 8.5, не стоит работать с более низкими скоростями потока, так как в этих условиях уменьшается эффективность разделения из-за отрицательного влияния продольной диффузии.

8.7. Кривые Ван-Деемтера и другие зависимости

На рис. 8.4 поясняются некоторые зависимости.

Кривая h/v (в верхнем левом углу) описывается уравнением, приводимым ниже. Одно из широко применяемых в ВЭЖХ уравнений, которое уже приводилось в разделе 8.6:

$$h = v^{0,33} + \frac{2}{v} + 0,1v.$$

Форма кривой не зависит от размера колонки и диаметра частиц, но зависит от качества упаковки, коэффициента диффузии и свойств массопереноса системы: аналит — подвижная фаза — стационарная фаза. На рис. 8.3 изображена та же зависимость, но в двойном логарифмическом масштабе.

Более распространенная кривая H/u (классическая Ван-Деемтеровская зависимость, вверху справа) получается из кривой h/v для определенного размера частиц и коэффициента диффузии: $H = hd_p$ и $u = vD_m/d_p$. Приведенная здесь кривая дана для частиц диаметром 5 мкм с коэффициентом диффузии аналита равным $1 \cdot 10^{-9}$ м²/с, свойственным обращенной фазе. У сорбентов с меньшими частицами кривая проходит ниже. У нормально-фазовых разделений минимальное значение располагается правее, так как коэффициент диффузии у них выше (см. раздел 8.8). Масштабы обеих осей соответствуют масштабу кривой h/v .

В отличие от подхода Ван-Деемтера, большинство хроматографистов больше заботятся о числе теоретических тарелок N и объемной скорости потока F

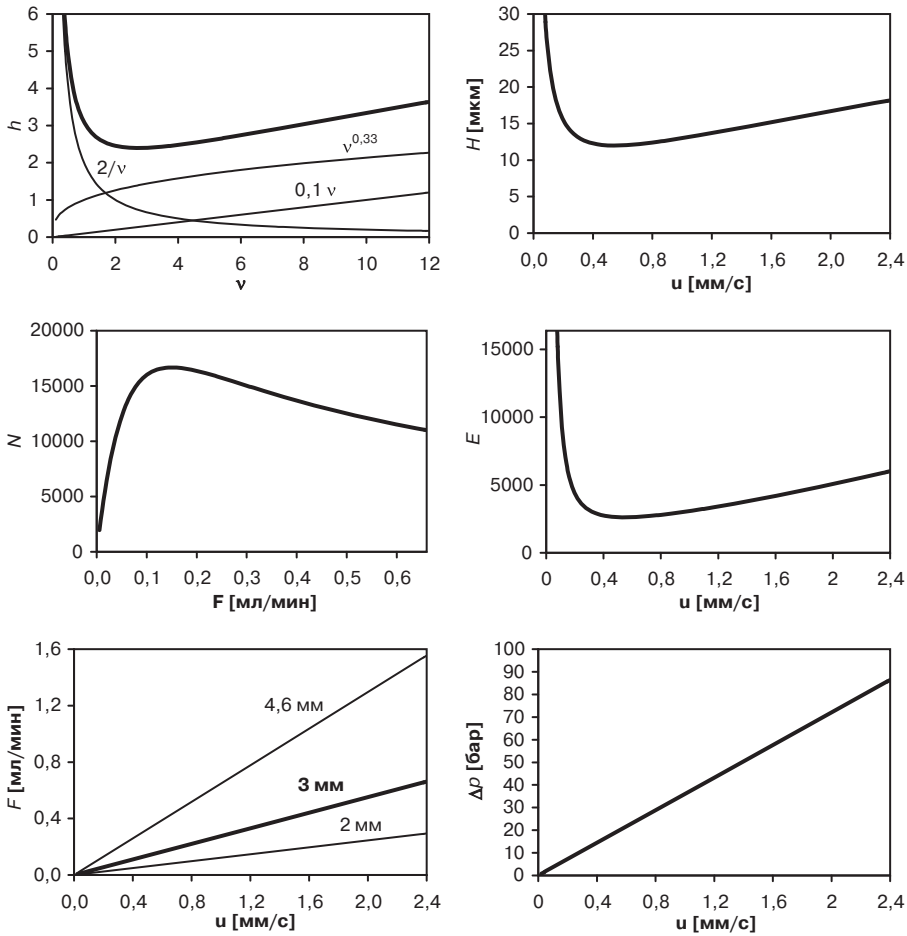


Рис. 8.4. Различные кривые Ван-Деемтера и графики зависимости. Более подробно разъясняется в разделе 8.7. Кривая h/v в верхнем левом углу применима ко многим типам сорбентов для ВЭЖХ. Другие графики иллюстрируют свойства строго определенных фазовых систем и зависят от размера колонки

(левый график в среднем ряду), чем о высоте тарелок H и линейной скорости потока u . Показанная здесь кривая применима к колонкам длиной 20 см ($N = L_c/H$), с внутренним диаметром 3 мм и пористостью 0,65, обычной для привитых фаз ($F = u d_c^2 \pi \epsilon / 4$, при этом на рисунке секунды преобразованы в минуты). В этих условиях $2,4 \text{ мм}^2/\text{с}$ соответствует $0,66 \text{ мл/мин}$. У кривой N/F есть максимум.

Безразмерная величина сопротивление разделению E зависит от u (или F) и имеет минимум, как и кривая Ван-Деемтера (правый график в среднем ряду). При коэффициенте Козени – Кармана $\Phi = 1000$ приходим к зависимости:

$$E = h^2 \cdot 1000 \cdot \epsilon.$$

Нижний ряд графиков отображает линейные зависимости. Объемная скорость потока прямо пропорциональна линейной скорости потока (внизу слева).

Она зависит от пористости и внутреннего диаметра колонки. На рисунке изображен график для $\varepsilon = 0,65$ (привитая фаза). При $\varepsilon = 0,8$, что характерно для непривитого силикагеля, наклон прямых был бы круче. На графике приведены данные для трех колонок разных диаметров.

И наконец, давление пропорционально линейной скорости потока (нижний ряд справа) или объемной скорости потока (что довольно очевидно). График действителен при $\varphi = 1000$, $\eta = 1$ мПа·с (вода-ацетонитрил), $L_c = 20$ см, $\varepsilon = 0,65$, $d_p = 5$ мкм.

8.8. Коэффициенты диффузии¹

Коэффициент диффузии можно рассчитать по уравнению Уилки и Чанга²:

$$D_m \text{ (м}^2\text{/с)} = \frac{7,4 \cdot 10^{-12} \sqrt{\Psi M T}}{\eta \text{ (мПа} \cdot \text{с)} [V_s \text{ (см}^3\text{/моль)}]^{0,6}},$$

где Ψ — константа растворителя (2,6 — воды, 1,9 — метанола, 1,5 — этанола, 1 — других (неассоциированных) растворителей), M — молярная масса (молекулярный вес) растворителя, T — абсолютная температура, η — вязкость растворителя и V_s — молярный объем анализируемого соединения [рассчитанный по молярной массе (г/моль), разделенной на плотность (г/см³)]. Точность расчета $\pm 20\%$.

Ниже приведены значения коэффициентов диффузии нескольких небольших молекул при 20 °С:

Нитробензол в гексане	$3,8 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2\text{/с} = 2,3 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2\text{/мин}$
Фенол в метаноле	$1,9 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2\text{/с} = 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2\text{/мин}$
Фенол в воде	$9,7 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2\text{/с} = 5,8 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2\text{/мин}$
Фенол в воде-метаноле (1:1)	$6,1 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2\text{/с} = 3,7 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2\text{/мин}$

Как показывает опыт, коэффициенты диффузии небольших молекул в нормально-фазовых сорбентах можно принять равными $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2\text{/мин}$, в обращенно-фазовых сорбентах $6,4 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2\text{/мин}$ ³.

Задача 25

Рассчитать коэффициент диффузии фенола в смеси метанол-вода (1:1) при 20 °С. Вязкость элюента равна 1,76 мПа·с.

Решение

Значения Ψ и M смеси растворителей определяются исходя из их молярного соотношения:

¹ Экспериментальное определение коэффициента диффузии в ВЭЖХ: E. Crushka and S. Levin, in *Quantitative Analysis Using Chromatographic Techniques*, E. Katz (ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York, 1987, pp. 360–374.

² C. R. Wilke and P. Chang, *Am. Ins. Chem. Eng. J.*, **1**, 264 (1955).

³ $1 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2\text{/с} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2\text{/с} = 6 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2\text{/мин}$.



1 объемная часть воды плотностью $1 \text{ г/см}^3 = 1$ части по массе;

1 объемная часть метанола плотностью $0,79 \text{ г/см}^3 = 0,79$ частям по массе;

1 часть по массе воды, $18 \text{ г/моль} = 0,056$ молярным частям;

$0,79$ частей по массе метанола, $32 \text{ г/моль} = 0,025$ молярным частям;

общее количество $= 0,081$ молярным частям.

Молярная часть воды $= 0,056/0,081 = 0,69$

Молярная часть метанола $= 0,025/0,081 = 0,31$

$\Psi = 0,69(2,6) + 0,31(1,9) = 2,38$

$M = 0,69(18) + 0,31(32) = 22,3$

$T = 293 \text{ К}$

Фенетол: $\text{C}_6\text{H}_5\text{OCH}_2\text{CH}_3 = \text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$, молярная масса $= 122 \text{ г/моль}$, плотность $= 0,967 \text{ г/см}^3$.

$$V_{\text{фенетола}} = \frac{122 \text{ г} \cdot \text{см}^3}{0,967 \text{ г} \cdot \text{моль}} 126 \text{ см}^3/\text{моль},$$

$$D_m = \frac{7,4 \cdot 10^{-12} \sqrt{\Psi M T}}{\eta V^{0,6}},$$

$$D_m = \frac{7,4 \cdot 10^{-12} \sqrt{2,38 \cdot 22,3 \cdot 293} \text{ м}^2}{1,76 \cdot 126^{0,6} \text{ с}} = 4,9 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с} = 2,9 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{мин}.$$

Макромолекулы

У макромолекул большой молярный объем (их молекулярные массы велики, но в первом приближении не влияют на плотность). Например, молекула с той же плотностью, что и фенетол, но в 100 раз большей молекулярной массой с молярным объемом, равным $1,26 \cdot 10^4 \text{ см}^3/\text{моль}$, имеет невысокий коэффициент диффузии, равный $3,1 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$. В действительности, уравнение Уилки и Чанга неприменимо к макромолекулам и следует вводить следующие поправочные коэффициенты:

Молярная масса	Множитель для D_m
10^3	1,3
10^4	2,0
10^5	3,2

Поэтому коэффициент диффузии этой гипотетической макромолекулы равен $3,1 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с} \cdot 2 = 6,2 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с} = 3,7 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{мин}$.

Тот факт, что макромолекулы обладают невысокими коэффициентами диффузии, является для хроматографии очень важным.

Задача 26

Определить значение линейной скорости u подвижной фазы при хроматографировании фенетола ($D_m = 0,49 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$) и гипотетической молекулы ($D_m = 6,2 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$) при оптимальной приведенной скорости потока $v_{\text{опт}} = 3$. Диаметр частиц d_p сорбента равен 5 мкм.

Решение

$$v = \frac{u d_p}{D_m}$$

$$u = \frac{v D_m}{d_p}$$

Фенетол:

$$u = \frac{3 \cdot 0,49 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2}{5 \cdot 10^{-6} \text{ м} \cdot \text{с}} = 0,29 \cdot 10^{-3} \text{ м/с} = 0,29 \text{ мм/с}.$$

Макромолекула:

$$u = \frac{3 \cdot 6,2 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2}{5 \cdot 10^{-6} \text{ м} \cdot \text{с}} = 3,7 \cdot 10^{-5} \text{ м/с} = 0,037 \text{ мм/с}.$$

Время проскока составляет 344 с (меньше 6 мин) в первом случае и 2700 с (45 мин) — во втором при длине колонки 10 см. Поэтому макромолекулы следует хроматографировать с малой скоростью потока!

ГЛАВА 9

АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ: НОРМАЛЬНО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Этот метод рассматривается на примере силикагеля — наиболее важного хроматографического адсорбента.

9.1. Что такое адсорбция?¹

Как уже отмечалось в разделе 7.4, поверхность силикагеля насыщена силанольными группами, таким образом, ОН-группы статистически распределены по всей поверхности (рис. 9.1).

Силанольные группы представляют собой активные центры стационарной фазы (в окиси алюминия Al^{3+} — центры связаны с O^{2-} и это приводит к тому, что они приподняты над поверхностью). Они могут образовывать связи «слабого» типа с какой-либо молекулой, находящейся поблизости, вступая в следующие взаимодействия:

- диполь-индуцированный диполь²;
- диполь-диполь;
- водородная связь;
- π -комплекс.

Такие ситуации возникают, когда молекула имеет один или несколько атомов с неподеленными электронными парами или двойную связь (для образования π -комплекса) — другими словами, когда она ненасыщенна или содержит так называемую функциональную группу. При этом алканы неспособны к такого рода взаимодействиям, поскольку они насыщены, и атомы углерода и водорода, составляющие их молекулы, не содержат неподеленных электронных пар.

Сила адсорбции и соответствующие ей величины k (элюотропный ряд) возрастают в следующем порядке:

Насыщенные углеводороды < олефины < ароматические \approx органические галогенсодержащие соединения < сульфиды < простые

¹ Стандартный учебник: L. R. Snyder, *Principles of Adsorption Chromatography*, Dekker, New York, 1968.

² Молекула или функциональная группа взаимодействуют как диполь, когда в них распределение электронной плотности неравномерно. Когда заряд возникает исключительно под действием внешнего поля, диполь называют индуцированным.

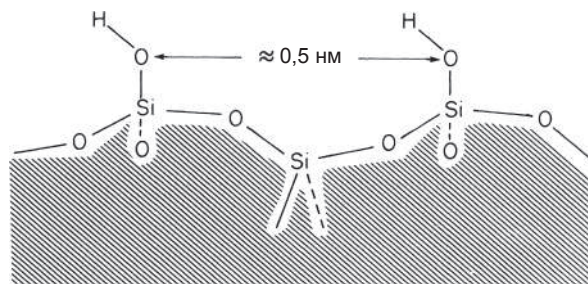


Рис. 9.1. Поверхность силикагеля

эфирь < нитросоединения < сложные эфиры \approx альдегиды \approx кетоны < спирты \approx амины < сульфоны < сульфоксиды < амиды < карбоновые кислоты.

Если молекула имеет несколько функциональных групп, то ее удерживание определяет самая полярная (ближайшая к концу элюотропного ряда). Образование «слабой связи» называется адсорбцией, а ее разрыв, такой же быстрый, как и образование, называется десорбцией.

Из этой концепции можно сделать три вывода:

- а) силикагель в хроматографическом слое/колонке со всех сторон окружен подвижной фазой. Растворитель в той или иной степени обволакивает все активные центры. Молекулы образца могут адсорбироваться, если взаимодействие сорбента с образцом более сильное, чем с растворителем;
- б) все молекулы образца (точно так же, как и молекулы растворителя) расположены на поверхности силикагеля таким образом, что их функциональные группы или двойные связи приближены к силанольным группам (рис. 9.2). Любые возможные углеводородные «хвосты» направлены в противоположную сторону от силикагеля. Следовательно, адсорбент не может различить те молекулы, у которых одинаковые функциональные группы, но алифатические части разные. Удовлетворительно разделить смесь гексанола, гептанола и октанола адсорбционной хроматографией невозможно;
- в) сила взаимодействия между силанольными группами силикагеля и молекулами образца зависит не только от функциональных групп молекул

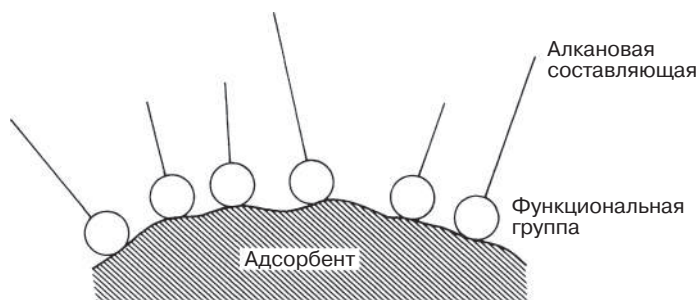
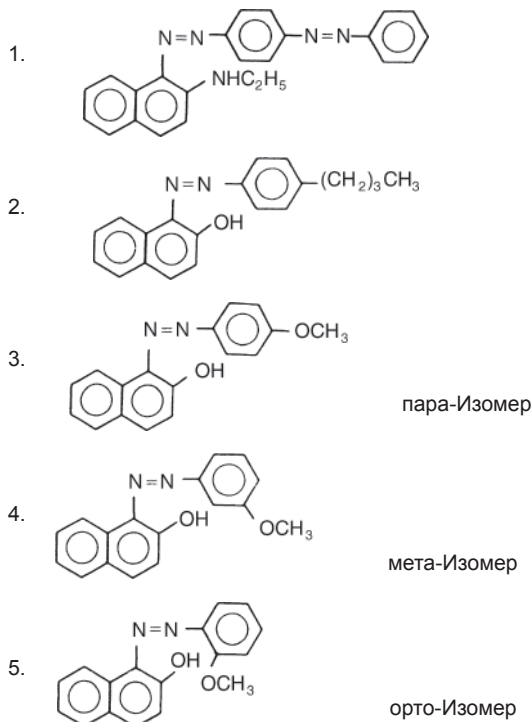


Рис. 9.2. В процессе адсорбции функциональные группы направлены к поверхности силикагеля



образца, но также и от стерических факторов. Молекулы с различной пространственной структурой, такие, например, как изомеры, прекрасно подходят для разделения с помощью адсорбционной хроматографии. Разделение азокрасителей со следующими структурными формулами:



прекрасно иллюстрирует это положение (см. рис. 2.11 и задачу 5).

Этому качественному утверждению можно придать количественный характер. Если известны равновесные концентрации образца в подвижной и стационарной фазах, то можно вычислить *коэффициент распределения* K (см. раздел 2.1). В общем случае K не является константой и зависит от количества образца и температуры. Концентрация образца в стационарной фазе как функция концентрации образца в подвижной фазе при постоянной температуре описывается *изотермой адсорбции*, которая характерна для данной хроматографической системы (образец — подвижная фаза — стационарная фаза)¹.

¹ Наиболее распространенная изотерма адсорбции на силикагеле есть изотерма Ленгмюровского типа, идеальный вид которой таков:



9.2. Элюотропный ряд

Как следует из вышесказанного, не каждая подвижная фаза элюирует молекулы образца с одинаковой скоростью. Если подвижная фаза — алифатический углеводород, то ей очень трудно заместить молекулы образца на активных центрах на поверхности сорбента. Растворитель в этом случае считается *слабым*. Тетрагидрофуран наоборот сильно конкурирует за активные центры с молекулами образца, оставляя им меньше времени быть адсорбированными на поверхности стационарной фазы, и потому они быстро элюируются. Этот тип растворителя сравнительно *сильный*.

Влияние подвижной фазы на разделение показано на рис. 9.3. Для анализа этой тестовой смеси чистый гексан является слишком слабым растворителем, и разделение требует неоправданно много времени. Метил-*трет*-бутиловый эфир для этих целей слишком сильный. Подходящим элюентом в этом случае будет смесь гексан — метил-*трет*-бутиловый эфир (9:1) (по объему).

Элюирующая сила или сила различных растворителей определяется эмпирически и обозначается символом ϵ^0 . Ряд растворителей различной силы (от слабых к сильным) называется элюотропным. Он показан в разделе 5.1.4.

Можно получить необходимую элюирующую силу смешиванием двух растворителей. Возможные варианты бинарных смесей показаны на рис. 9.4. Если, к примеру, необходима элюирующая сила $\epsilon^0 = 0,4$, то она может быть получена, если использовать следующие бинарные элюенты:

- Приблизительно 60 % метил-*трет*-бутилового эфира в гексане
- 45 % тетрагидрофурана в гексане
- 50 % этилацетата в гексане
- 15 % изопропанола в гексане
- 20 % метил-*трет*-бутилового эфира в хлористом метиле
- 45 % тетрагидрофурана в хлористом метиле
- 50 % этилацетата в хлористом метиле
- или 20 % изопропанола в хлористом метиле

К сожалению, вычисление элюирующей силы смеси растворителей достаточно сложно и не может быть сделано без помощи компьютера¹.

9.3. Селективные свойства подвижной фазы

Селективность элюента есть способность различных подвижных фаз изменять коэффициент селективности α двух или более соединений, присутствующих в образце. Она не имеет ничего общего с элюирующей силой ϵ^0 , но это еще один параметр, который позволяет влиять на разделение. Селективность в адсорбционной хроматографии имеет два различных аспекта: локализацию и основность.

¹ M. D. Palamareva and H. E. Palamarev, *J. Chromatogr.*, **477**, 235 (1989).

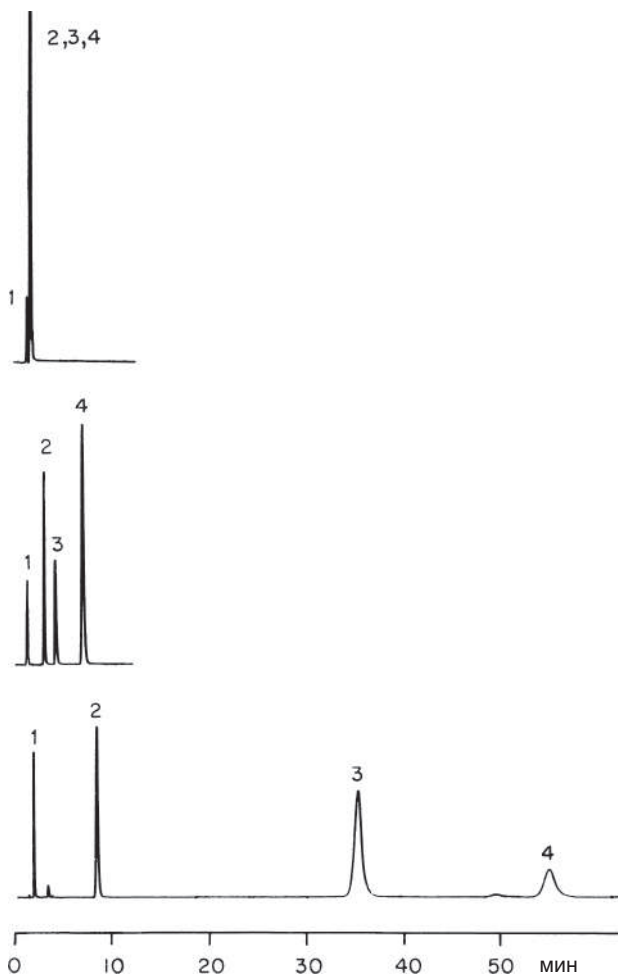


Рис. 9.3. Разделение тестовой смеси на силикагеле элюентами разной силы. Верхняя хроматограмма: метил-*трет*-бутиловый эфир, $\epsilon^0 = 0,48$; средняя хроматограмма: гексан — метил-*трет*-бутиловый эфир (9:1), $\epsilon^0 = 0,29$; нижняя хроматограмма: гексан, $\epsilon^0 = 0$. Чувствительность на нижней хроматограмме вдвое меньше, чем на двух других. Условия: колонка, $250 \times 3,2$ мм; стационарная фаза LiChrosorb SI 60 5 мкм; скорость потока, 1 мл/мин; УФ-детектор, 254 нм. Пики: 1 — *n*-ксилол; 2 — нитробензол; 3 — ацетофенон; 4 — 2,6-динитротолуол

Локализация есть мера способности молекул растворителя взаимодействовать с адсорбентом, который используется в качестве стационарной фазы¹. Как уже отмечалось в разделе 9.1, центры адсорбции на силикагеле — его силанольные группы. Молекулы, которые могут взаимодействовать с этими центрами посредством своих функциональных групп, таких как простые эфирные, сложнотэфирные, спиртовые, нитрильные и аминогруппы, будут ориентироваться

¹ L. R. Snyder, J. L. Glajch and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.*, **218**, 299 (1981).

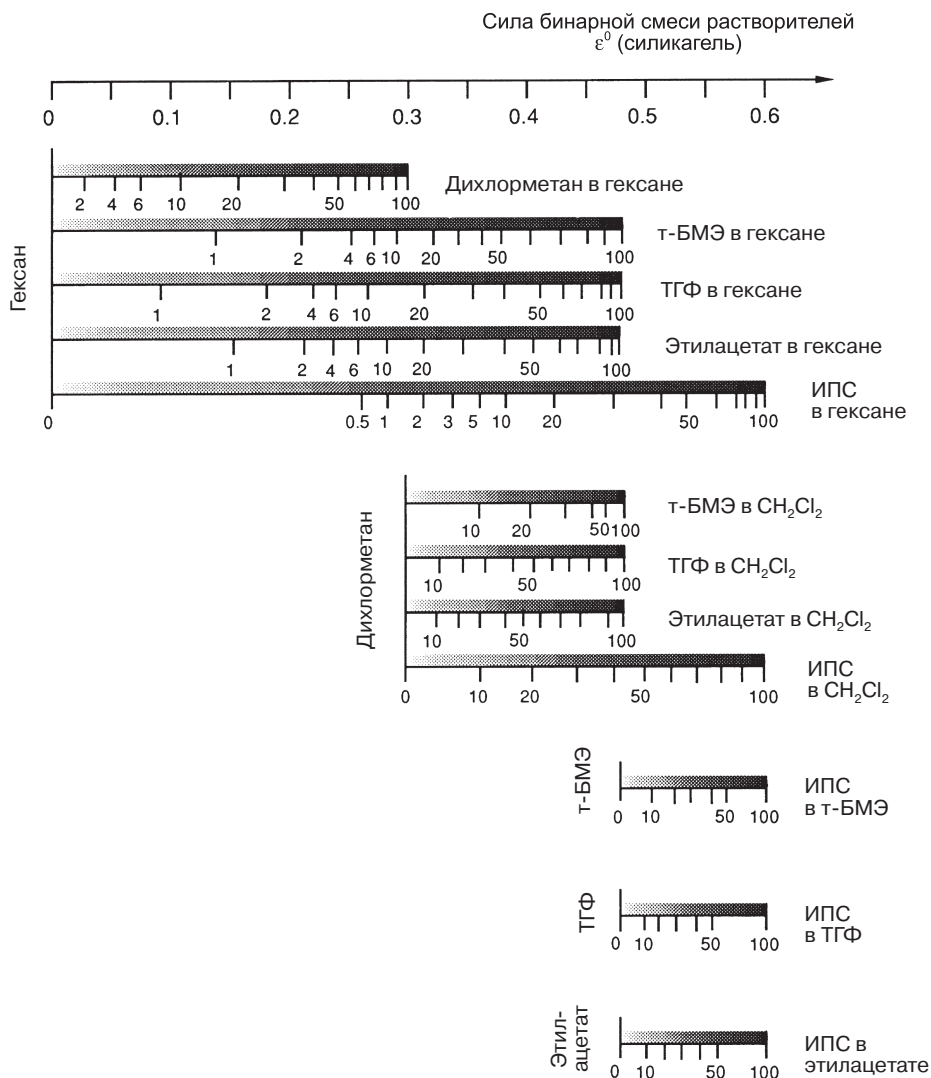


Рис. 9.4. Элюирующая сила бинарных смесей, используемых для адсорбционной хроматографии на силикагеле [с разрешения М. D. Palamareva V. R. Meyer, *J. Chromatogr.*, **641**, 391 (1993)]. Схема охватывает 12 возможных смесей, состоящих из гексана, метил-*трет*-бутилового эфира, тетрагидрофурана, этилацетата и изопропанола

таким образом, чтобы оказаться вблизи силанольных групп. Силикагель, окруженный локализуемым таким образом растворителем или образцом, покрыт четко выраженным слоем молекул. В противоположность этому нелокализуемый растворитель или образец, такой как хлористый метилен или бензол, будет взаимодействовать с силикагелем гораздо слабее и случайным образом. На рис. 9.5 проиллюстрированы эти ситуации.

Растворители из раздела 5.1 в верхней половине таблицы от фторалканов до дихлорэтана представляют собой, за исключением диэтилового эфира,

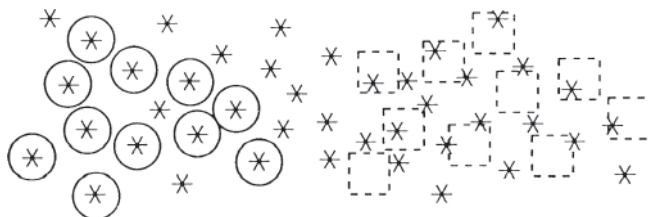


Рис. 9.5. Локализующиеся (○) и нелокализующиеся (⊖) молекулы и их взаимодействие с адсорбентом. Вид сверху поверхности силикагеля. Его адсорбционные центры (силанольные группы) обозначены звездочками

нелокализующиеся растворители. Диэтиловый эфир, а также растворители из второй половины таблицы от триэтиламина до воды являются локализующимися. Таким образом, два растворителя — хлористый метилен (нелокализующийся) и диэтиловый эфир (локализующийся) — в плане селективности очень отличаются друг от друга, несмотря на их сходную элюирующую силу ($\epsilon^0 = 0,30$ и $\epsilon^0 = 0,29$ соответственно).

Основность является одной из осей треугольника селективности растворителей, изображенного на рис. 5.1. Самыми основными растворителями из используемых в ВЭЖХ являются простые эфиры.

9.4. Выбор и оптимизация состава подвижной фазы

Оптимальная элюирующая способность подвижной фазы для конкретного разделения может быть определена с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). На тонкослойной хроматограмме оптимальный растворитель или смесь растворителей дают величину $R_f \approx 0,3$. Результаты ТСХ легко переносятся на ВЭЖХ и значение k можно предсказать, если стационарная фаза в обоих методах одна и та же, хотя и различается по размеру частиц сорбента¹. Поскольку дистанции в 5 см вполне достаточно для развития фронта, то этот тест можно проводить на маленьких ТСХ-пластинках и за очень короткое время. Из небольших плотно закрывающихся банок для варенья получают хорошие камеры для ТСХ.

Зоны веществ можно детектировать:

- а) УФ-излучением (для веществ, поглощающих в УФ-диапазоне; можно использовать пластинки с флуоресцентными индикаторами);
- б) иодными парами;
- в) распылением подходящих для этого случая реагентов, если два первых метода не помогли.

ТСХ-тест поможет определиться с подбором нужной элюирующей силы (ϵ^0), но селективность может потребовать оптимизации, поскольку индивидуальные пики могут оставаться лишь частично разрешенными.

¹ W. Jost, H. E. Hauck and F. Eisenbeiss, *Kontakte Merck*, 3/84, 45 (1984); F. Geiss, *Fundamentals of Thin-Layer Chromatography*, Hüthig, Heidelberg, 1986, глава 10: «Transfer TLC Separations to Columns»; см. также P. Renold, E. Madero and T. Maetzke, *J. Chromatogr. A*, **908**, 143 (2001)

Для того чтобы достичь изменений в селективности, необходимо выбрать растворители, которые различаются по локализации и основности. Во многих случаях подвижная фаза состоит из двух растворителей — А и Б. Обычно растворитель А — это гексан, не имеющий ни элюирующей силы, ни основности и нелокализующийся. Однако гептан (у которого тоже $\epsilon^0 = 0$) предпочтительнее, поскольку гексан нейротоксичен. В качестве растворителя Б можно использовать как нелокализующийся, так и локализующийся неосновный растворитель, а также локализующийся основной¹. Для систематического контроля селективности и для того, чтобы получить максимально возможные изменения в элюции, нужно постараться провести разделение со всеми типами растворителя Б.

Типичный *нелокализующийся растворитель Б* — хлористый метилен.

Типичные *неосновные локализующиеся растворители Б* — ацетонитрил и этилацетат. Ацетонитрил незначительно растворим в гексане; этилацетат поглощает в УФ области до 260 нм.

Типичный *основной локализующийся растворитель Б* — метил-трет-бутиловый эфир.

Поскольку селективность растворителей не единственное свойство, которое можно использовать на практике, для оптимизации разделения могут быть использованы и другие растворители. По экологическим причинам галогеновые производные должны использоваться лишь в тех случаях, когда это действительно необходимо. Рисунок 9.4 дан в помощь тем, кому нужно приготовить различные смеси растворителей с похожей элюирующей силой. Если образец включает в себя соединения с кислыми свойствами, то, может быть, нужно добавить в элюент небольшое количество уксусной, трифторуксусной или муравьиной кислоты. Для основных веществ такой возможной добавкой является триэтиламин.

Дезактиваторы

Адсорбционные центры на силикагеле (или на окиси алюминия) имеют разную активность. Из-за этого колонка довольно быстро перегружается и, таким образом, масса образца влияет на коэффициент удерживания, даже в тех случаях, когда вводят его (образца) небольшое количество (см. раздел 2.7). При этом также происходит уширение задних фронтов пиков.

Емкость адсорбента по отношению к образцу может быть использована полностью только тогда, когда наиболее активные центры адсорбции заведомо дезактивированы. Этого можно достичь, добавляя небольшое количество локализующего вещества (дезактиватора) в подвижную фазу. Дезактиватор стремится заблокировать центры наибольшей «активности», и таким образом, молекулы образца будут взаимодействовать с однородной поверхностью адсорбента. При этом каждый оставшийся центр адсорбции будет иметь примерно одинаковый уровень активности.

Вода является наиболее важным дезактиватором (модератором). Она очень полярна и присутствует во всех растворителях, пусть даже и в следовых количествах. В случае с более полярными подвижными фазами и на уже неоднократно

¹ J. J. Kirkland, J. L. Glajch and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* **238**, 269 (1982).



использованных колонках ее влияние на процесс разделения менее выражено (новые колонки к ней более чувствительны). Такие спирты, как метанол, этанол или изопропанол, тоже могут быть дезактиваторами. Хотя это, как правило, и не нужно, но контроль за содержанием дезактиваторов может быть необходим в случае, если используется чистый неполярный растворитель А или разделение очень чувствительно к составу подвижной фазы¹.

Градиентная элюция в адсорбционной хроматографии возможна² (см. рис. 9.7), если разница в полярности двух растворителей не очень велика. Она может быть более сложной и потому в меньшей степени рекомендована к использованию, чем в обращенно-фазовой хроматографии:

- а) растворители могут расслаиваться внутри колонны, т. е. более полярный растворитель может адсорбироваться³;
- б) содержание модификатора может измениться;
- в) переуравновешивание может быть длительным;
- г) не стоит начинать градиент с 0 %Б. Лучше с определенного (возможно, очень небольшого) количества сильного растворителя.

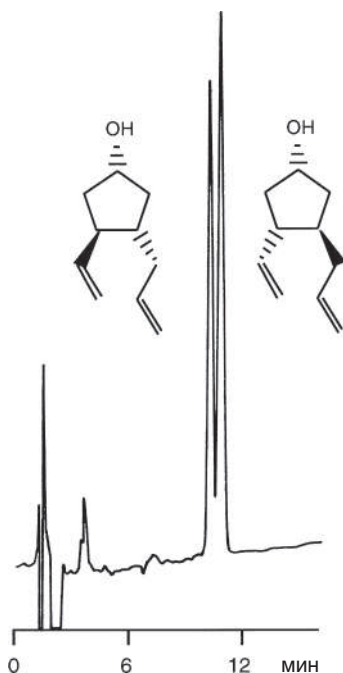


Рис. 9.6. Разделение диастереомерных спиртов. Условия: колонка 250×3,2 мм; стационарная фаза LiChrosorb SI 60, 5 мкм; подвижная фаза 1 мл/мин гексан — изопропанол (99:1); рефрактометрический детектор

¹ D. L. Saunders, *J. Chromatogr.*, **125**, 163 (1976).

² V. R. Meyer, *J. Chromatogr. A*, **768**, 315 (1997); P. Jandera, *J. Chromatogr. A*, **965**, 239 (2002).

³ Более правильно называть этот процесс обеднением или дискриминацией состава элюента, поскольку это не расслоение в прямом смысле этого слова. — *Прим. пер.*

9.5. Приложения

Силикагель является прекрасной стационарной фазой для разделения изомеров. На обложке этой книги показано разделение петазола и изопетазола — двух соединений, найденных в *Petasites hybridus* (белокопытнике), которые различаются только положением одной из двойных связей. Подвижной фазой был чистый диэтиловый эфир. На рис. 9.6 показано разделение диастереомеров.

Как уже говорилось ранее, градиентная элюция в общем случае не может быть рекомендована для разделения сложных смесей на силикагеле, поскольку переуравновешивание до исходных условий может занять больше времени, чем в случае с привитыми фазами. Тем не менее такой метод с успехом может быть использован так, как это показано на рис. 9.7.

Рисунок 9.8 иллюстрирует разделение сильнополярных соединений на силикагеле. Каротиноид кроцетин, который является наиболее неполярным и элюируется первым, его моно- и дигликозилированные эфиры в числе тех соединений, которые выделяют из экстракта шафрана. Строго говоря, метод, который используется в данном случае, уже не адсорбционная хроматография.

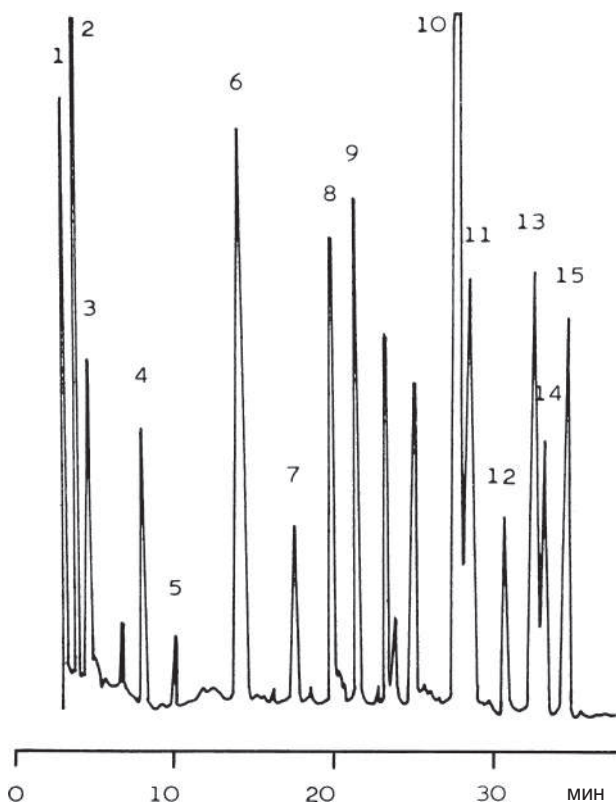


Рис. 9.7. Разделение каротиноидов красного перца в условиях градиентной элюции [воспроизводится с разрешения L. Almela, J.M. López-Roca, M.E. Candela and M.D. Alcázar, *J. Chromatogr.*, **502**, 95 (1990)]. Условия: образец — сапонифицированный (омыленный) экстракт красного сладкого перца; колонка 250×4,6 мм, стационарная фаза Spherisorb 5 мкм; подвижная фаза 1 мл/мин петролейный эфир — ацетон, линейный градиент от 5 до 25% ацетона за 30 мин, детекция в видимой области 460 нм. Пики: 1 — β -каротин; 2 — криптокапсин; 3 — криптофлавин; β — криптоксантин; 5 — антраксантин; 6 — капсoluteин; 7 — лютеоксантин; 8 — зеаксантин; 9 — мута-токсантин; 10 — капсантин; 11 — капсантин-5,6-эпоксид; 12 — виолаксантин; 13 — капсорубин; 14 — изомер капсорубина; 15 — неоксантин

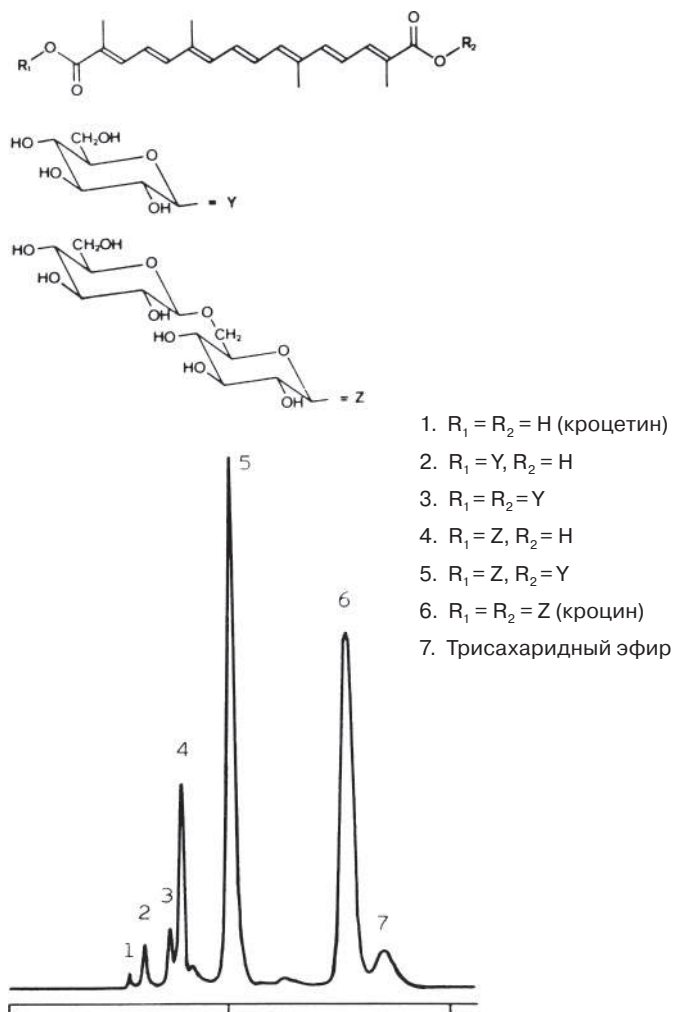


Рис. 9.8. Разделение очищенного экстракта шафрана [печатается с разрешения Н. Pfander and M. Rychener, *J. Chromatogr.*, **234**, 443 (1982)]. Условия: колонка 250×4,6 мм, стационарная фаза Lichrosorb SI 60, 7 мкм; подвижная фаза 0,6 мл/мин этилацетат — изопропанол — вода (56:34:10); детектирование в видимой области 440 нм

В условиях подвижной фазы с очень высокой полярностью она превращается в распределительную хроматографию¹ в системе «жидкость-жидкость»².

Разделение кислых и основных продуктов в условиях адсорбционной хроматографии может быть осложнено. Для таких случаев больше подходят обращенно-фазовая и ионообменная хроматография, но тут могут возникать проблемы с растворимостью. Одним из решений может быть использование

¹ Распределительная хроматография на нормальной фазе называется гидрофильной ГИХ (HILIC). — *Прим. пер.*

² См. также: R. W. Schmid and C. Wolf, *Chromatographia*, **24**, 713 (1987).

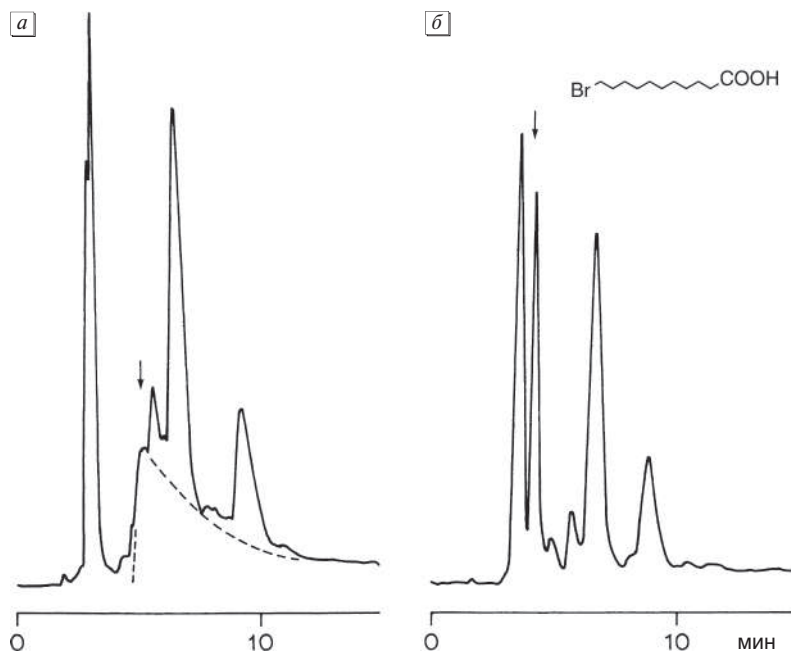


Рис. 9.9. Разделение ω -бромундекановой кислоты [печатается с разрешения Marcel Dekker Inc., from R. Schwarzenbach, *J. Liq. Chromatogr.*, **2**, 205 (1979)]. Условия: образец — реакционная масса после этерификации; колонка $250 \times 4,6$ мм, стационарная фаза Lichrospher SI 100, 5 мкм; подвижная фаза 1 мл/мин гексан — диэтиловый эфир (2:3); УФ-детектор. *a* — Необработанный силикагель; бромундекановая кислота элюируется с очень большим уширением заднего фронта пика и не может быть количественно определена; *б* — силикагель обработан цитратным буфером (pH 2,8): бромундекановая кислота выходит отчетливым пиком, при этом на элюцию других компонентов это не оказывает влияния

забуференного силикагеля, как это показано на рис. 9.9. Весь силикагель промывается либо заранее, либо уже в колонне буферным раствором с подходящим pH (кислый буфер для кислых образцов, основной — для основных). Соединения, с элюцией которых раньше были проблемы, элюируются без уширения задних фронтов пиков. При этом и нейтральные соединения элюируются без каких-либо изменений, потому что используются неполярные подвижные фазы (если растворитель слишком полярен, буферные соли могут быть вымыты)¹.

Дополнительные примеры адсорбционной хроматографии даны на рис. 2.11, 2.23, 2.28, 8.1, 21.1, 21.2 и 23.4.

¹ R. Schwarzenbach, *J. Chromatogr.*, **334**, 35 (1985).

ГЛАВА 10

ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

10.1. Основы

Обращенно-фазовая хроматография (ОФХ) — это вид хроматографии, в котором подвижная фаза полярнее неподвижной. Самый популярный сорбент ОФХ — химически связанный октадецилсилан (ODS), т.е. *n*-алкан с восемнадцатью атомами углерода. Кроме того, в качестве неподвижной фазы также используют силикагель с привитыми *n*-алканами с восемью атомами углерода и короче, с циклогексиловыми и фенильными группами. Фенильные группы полярнее алкильных.

О воде часто говорят как о самом сильном элюенте в хроматографии, но это касается только адсорбционных процессов. Она взаимодействует с активными центрами силикагеля и оксида алюминия, поэтому адсорбция молекул образца ограничена, а значит, образец элюируется достаточно быстро. В обращенно-фазовой хроматографии все в точности до наоборот: вода не может смачивать неполярные (гидрофобный — водоотталкивающий) алкильные группы, т.е. она не взаимодействует с ними ни при каких условиях. Следовательно, из всех элюентов, применяемых в ОФХ, вода обладает самой слабой элюирующей силой. Чем больше доля воды в подвижной фазе, тем дольше вещества удерживаются на сорбенте.

На рис. 10.1 это наглядно изображено. На обращенно-фазовой колонке элюировали бензол (2), хлорбензол (3), о-дихлорбензол (4) и йодбензол (5) смесью метанол — вода различного соотношения (1 — пик растворителя, в котором растворяли вещества).

Чем лучше вещества удерживаются на обращенно-фазовой поверхности, тем хуже они (поскольку более неполярные) растворяются в воде. Удерживание снижается в следующем порядке: алифатические соединения > индуцированные диполи (например, CCl_4) > постоянные диполи (например, CHCl_3) > слабые основания Льюиса¹ (эфир, альдегиды, кетоны) > сильные основания Льюиса (амины) > слабые кислоты Льюиса (спирты, фенолы) > сильные кислоты Льюиса (карбоновые кислоты).

Кроме того, время удерживания возрастает по мере увеличения числа атомов углерода в веществе. На рис. 10.2 показано разделение на обращенно-фазовой колонке дец-1-ена (1), ундец-1-ена (2), додец-1-ена (3), тридец-1-ена (4), тетрадец-1-ена (5). Существует общее правило: удерживание возрастает с увеличением

¹ Основание Льюиса — донор электронов, кислота Льюиса — акцептор электронов.

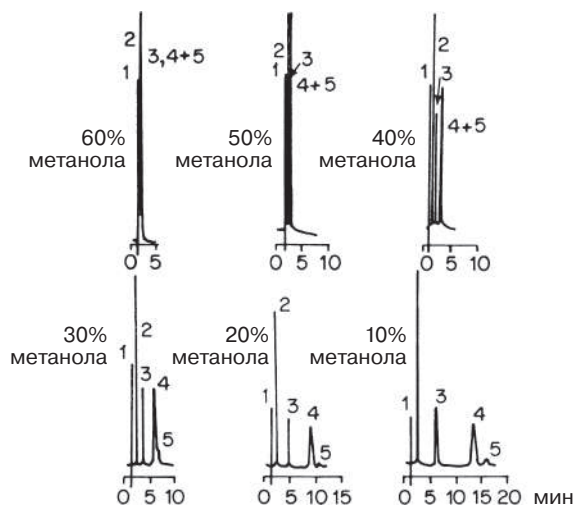


Рис. 10.1. Влияние состава подвижной фазы в обращенно-фазовой хроматографии (печатается с разрешения из N.A. Parris, *Instrumental Liquid Chromatography*, Elsevier, 1st ed., 1976, p. 157)

площади взаимодействия между молекулой вещества и сорбентом, т. е. с увеличением числа молекул воды, которые высвобождаются в процессе «адсорбции» вещества.

Соединения с разветвленной структурой элюируются быстрее по сравнению с соответствующими линейными изомерами.

Тем не менее механизмы удерживания на обращенной фазе сложны, и их до сих пор не так просто понять¹.

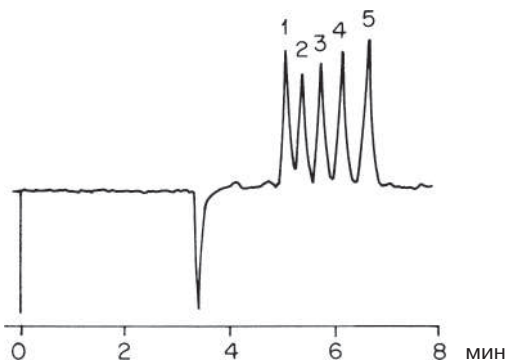


Рис. 10.2. Обращенно-фазовое разделение алкеновых гомологов (печатается с разрешения Du Pont). Условия: сорбент Zorbax ODS, элюент тетрагидрофуран — ацетонитрил (10–90) (это пример неводной обращенно-фазовой хроматографии!), скорость подвижной фазы 0,75 мл/мин, ИК-детектор, длина волны 3,4 мкм

¹ A. Vailaya and C. Horváth, *J. Chromatogr. A*, **829**, 1 (1998).

10.2. Подвижная фаза в обращенно-фазовой хроматографии

Обычно подвижная фаза представляет собой смесь воды, или водного буфера, с растворителями, которые смешиваются с водой, например:

метанол	
ацетонитрил	
этанол	
изопропанол	
диметилформамид	
пропан-1-ол	
диоксан	
тетрагидрофуран	
	↓
	снижение полярности
	увеличение элюирующей силы

Таким образом в обращенно-фазовой хроматографии неводные элюенты требуются для разделения высоко неполярных соединений.

Поскольку ОФХ разделения проходят в большинстве случаев в градиентном режиме, то растворители должны быть высокой степени чистоты¹ (рис. 18.6). Ранее был описан хроматографический тест для определения чистоты воды и растворителей², который состоял из серии градиентов с нарастающей и убывающей элюирующей силой. По нему можно оценить степень чистоты компонентов подвижной фазы.

Смеси воды с органическими растворителями обычно имеют более высокую вязкость по сравнению с чистыми растворителями. На рис. 10.3 показано

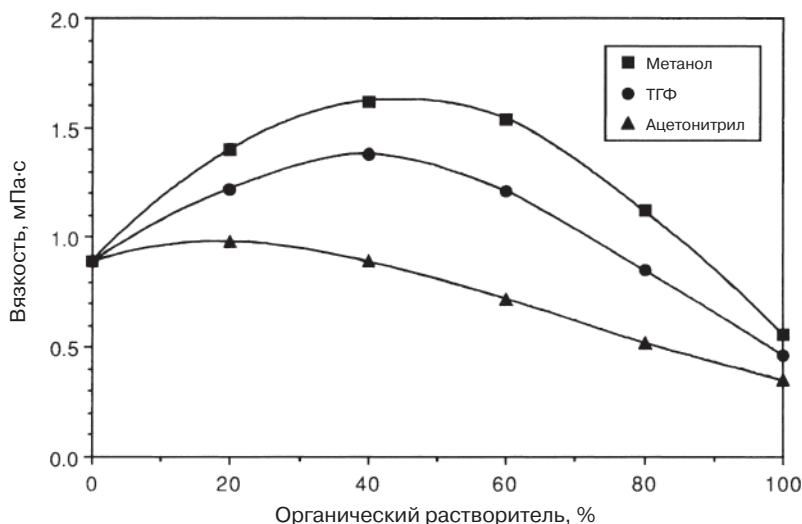


Рис. 10.3. Вязкость водных органических растворов при 25 °C (числовые значения взяты из статьи J. W. Dolan and L. R. Snyder, *Troubleshooting LC Systems*, Humana, Clifton, 1989, p. 85)

¹ S. Williams, *J. Chromatogr. A*, **1052**, 1 (2004).

² D. W. Bristol, *J. Chromatogr.*, **188**, 193 (1980).

изменение вязкости часто используемых смесей метанол-вода, тетрагидрофуран-вода и ацетонитрил-вода. Смесью метанол-вода достигается максимальной вязкости при 40 % метанола и эта вязкость составляет 1,62 мПа·с (25 °С), что почти в три раза больше вязкости чистого метанола или в два раза больше вязкости чистой воды. Перепад давления в колонке пропорционален вязкости, следовательно, он непостоянен в процессе градиентного анализа. Максимальная вязкость смеси 80 % уксусной кислоты в воде при 20 °С составляет 2,7 мПа·с, 40 % этанола в воде — 2,8 мПа·с при 20 °С.

Увы, даже вода¹ для ВЭЖХ нуждается в очистке и поэтому стоит дороже. Ионный обмен, как правило, не дает желаемого результата, а двойная дистилляция может увеличить количество органических примесей. Лучше всего покупать воду для ВЭЖХ или использовать многоступенчатую систему очистки. Стерильная вода становится после фильтрования через 0,2 мкм фильтр.

У метанола есть один недостаток — при смешивании с водой образуется раствор относительно высокой вязкости (см. текст выше), который, по сравнению с другими подвижными фазами, вызывает чрезвычайно большое увеличение давления в системе. Если приходится готовить смесь метанол-вода самим, тогда каждый компонент необходимо дозировать по массе или отмерять отдельно объемы растворителей. Если 500 мл воды довести метанолом до объема 1000 мл, то ввиду значительного сокращения объема раствора получится смесь с содержанием метанола более 50 %. По этой же причине времена удерживания веществ, элюируемых смесью вода-метанол (приготовленной вручную или смешиваемой в миксере хроматографа высокого давления), будут разными из-за того, что в случае смешивания на стороне высокого давления общая скорость потока будет ниже установленной. В тех случаях, когда требуется добавить солевой буфер или ион-парные реагенты, в качестве подвижной фазы лучше брать метанол, в котором они растворяются лучше, чем в ацетонитриле или в тетрагидрофуране.

Ацетонитрил достаточно дорогой, прозрачный в УФ-области растворитель. Не вызывает проблем и его вязкость. Следует обратить внимание на то, что ацетонитрил с водой образует азеотропную смесь, которая кипит при 76,7 °С и содержит 84 % ацетонитрила. Это важно для регенерации растворителя дистилляцией.

Тетрагидрофуран привлекателен своей селективностью. Он непрозрачен в УФ-области ниже 220 нм. Колонка после градиента с ТГФ медленнее возвращается в равновесное состояние по сравнению с градиентами, в которых использовался метанол или ацетонитрил. Не следует банку с ТГФ для ВЭЖХ хранить долго открытой, поскольку в ней довольно быстро образуются перекиси. Они могут вступать во взаимодействие с образцами и представлять угрозу окружающей среде.

В большинстве случаев не рекомендуется использовать элюенты, содержащие менее 10 % органического растворителя в воде². В таких условиях многие сорбенты щеточного типа с, например, C₁₈ алкильными цепочками приобре-

¹ S. Mabic, C. Regnault and J. Krol, *LC GC Eur.*, **18**, 410 (2005) or *LC GC North Am.*, **23**, 74 (2005).

² J. W. Dolan, *LC GC Int.*, **8**, 134 (1995) or *LC GC Mag.*, **13**, 96 (1995); M. Przybyciel and R. E. Majors, *LC GC Eur.*, **15**, 652 (2002) or *LC GC North Am.*, **20**, 516 (2002).



тают неопределенную конфигурацию и уравниваются длительное время. (Даже градиенты не стоит начинать с 0 %В, 10 %В достаточно слабая подвижная фаза.) В среде, содержащей более 10 % органического растворителя, цепи сорбента становятся более или менее вытянутыми. Если же слишком много водной составляющей (>90 %), то они опадают. В водной среде без органических добавок конформация привитой фазы снова становится определенной, и цепи полностью сворачиваются. Чтобы снова их выпрямить, нужно еще раз добавить органический растворитель. Этот процесс, однако, занимает некоторое время¹. В настоящее время производители сорбентов выпускают особый вид неподвижных фаз, которые устойчивы к элюентам с большим содержанием воды.

10.3. Селективность и сила растворителей²

Ранее в разделе 5.2 был описан треугольник селективности различных растворителей. Селективность элюента в обращенно-фазовых разделениях напрямую связана с этим треугольником, поскольку эффекты локализации растворителя, имеющие большое значение в адсорбционной хроматографии, никакой роли здесь не играют. На рис. 5.1 видно, что три растворителя: метанол, ацетонитрил и тетрагидрофуран — являются удачным выбором при оптимизации селективности. На рис. 10.4 изображен треугольник только с этими тремя растворителями.

Обычно в качестве растворителя А в ОФ ЖХ берут воду или водный буфер. Сила бинарной смеси элюента зависит не только от доли растворителя В, но определяется еще и свойствами образца и сорбента³. Как бы то ни было, если необходимо использовать другой растворитель в целях оптимизации селективности, можно использовать следующее уравнение, которое позволяет подобрать состав подвижной фазы:



Рис. 10.4. Треугольник растворителей для обращенно-фазовой хроматографии

¹ Другим объяснением низкой эффективности C_{18} сорбентов в среде с большим содержанием воды является «несмачиваемость пор».

² A. Klimek-Turek, T. H. Dzido and H. Engelhardt, *LC GC Eur.*, **21**, 33 (2008).

³ Эта тема раскрыта в работе S. Ahuja, *Selectivity and Detectability Optimizations in HPLC*, Wiley-Interscience, New York, 1989, Sections 6.3 and 6.4.

$$\Phi_{B1} P'_{B1} = \Phi_{B2} P'_{B2},$$

где Φ — объемная фракция определенного растворителя и P' — его полярность. Для каждого растворителя предложены разные значения полярности, за исключением воды, полярность которой принята за ноль. Ниже приведены данные из Snyder *et al.*¹:

$P'_{\text{вода}}$	0
$P'_{\text{метанол}}$	3,0
$P'_{\text{ацетонитрил}}$	3,1
$P'_{\text{тетрагидрофуран}}$	4,4

При этом можно использовать номограмму, которая основана на экспериментальных данных по разделению небольших органических молекул². На самом деле у каждого вещества должна быть своя номограмма. На рис. 10.5 графически представлено изменение силы бинарной смеси растворителей (к крупным молекулам эти закономерности применимы в меньшей степени).

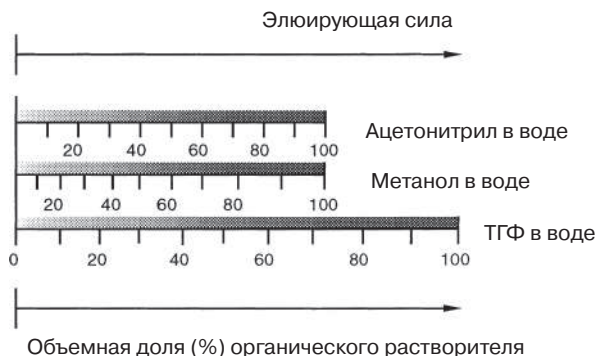


Рис. 10.5. Сила бинарных смесей растворителей в обращенно-фазовой хроматографии

Задача 27

Элюция вещества 70 % метанолом дает достаточное удерживание, но малую селективность. Какой смесью растворителей можно заменить 70 % метанол?

Решение

Другую смесь растворителей можно подобрать по уравнению:

$$\Phi_{ACN} = \frac{\Phi_{MeOH} P'_{MeOH}}{P'_{ACN}} = \frac{0,7 \cdot 3,0}{3,1} = 0,68 = 68\%$$

или:

$$\Phi_{THF} = \frac{0,7 \cdot 3,0}{4,4} = 0,48 = 48\%.$$

¹ L. R. Snyder, J. W. Dolan and J. R. Gant, *J. Chromatogr.*, **165**, 3 (1979).

² P. J. Schoenmakers, H. A. H. Billiet and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, **185**, 179 (1979).

Или по номограмме:

$$\Phi_{THF} = 45\%, \Phi_{ACN} = 60\%.$$

Очевидно, что оба метода позволяют определить только приблизительный состав подвижной фазы. На рис. 10.6 показано, как меняется характер разделения в зависимости от выбранного растворителя В. Образец — экстракт белокорытника (*Petasites hybridus*). Проба лучше всего разделяется при использовании ацетонитрила. В случае с тетрагидрофураном пики размыты и плохо разрешены. Метанол вызывает уширение задних фронтов пиков, а в конце разделения еще и селективность стала хуже по сравнению с разделением, в котором использовался ацетонитрил.

Если нужно тонко регулировать селективность, то в качестве третьего компонента добавляют небольшое количество другого органического растворителя.

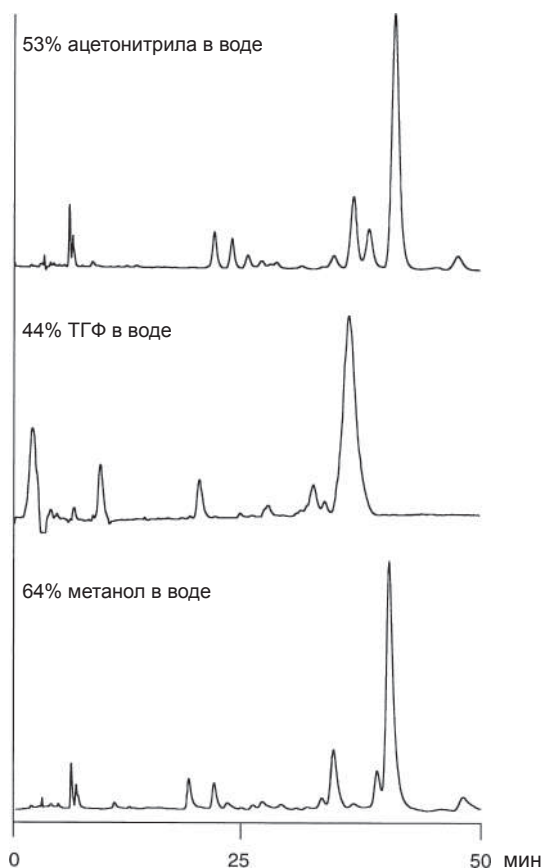


Рис. 10.6. Селективность разделения в зависимости от растворителя В (S. Jordi, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Bern). Условия: образец — экстракт *Petasites hybridus*, колонка 250×4,6 мм, сорбент YMC Carotenoid C30, 3 мкм, подвижная фаза — растворитель В в воде (содержание указано на рисунке), скорость подвижной фазы 0,9 мл/мин, УФ, 230 нм

Но этот способ достаточно сложен и его, как правило, не рекомендуют применять при разработке методики. Возможными добавками могут быть хлористый метилен (для хлорсодержащих образцов) или *N,N*-диметилформамид (для ароматических аминов и *N*-гетероциклов). Для ионных образцов очень важно регулировать pH буфера. Для разделения основных соединений необходимо в элюент добавлять «конкурирующее основание», например следовые количества триэтиламина (это верно для сорбентов на основе силикагеля типа А). Он интенсивно взаимодействует с силанольными группами, которые еще доступны аналиту. Все же лучше в таких случаях использовать сорбент, специально предназначенный для разделения оснований (раздел 10.4). Кроме того, в качестве «универсальной добавки» рекомендуется ацетат аммония. В настоящее время, однако, создают современные типы сорбентов, вещества на которых хорошо разделяются и без него.

10.4. Обращенно-фазовые неподвижные сорбенты

Обращенно-фазовые сорбенты более или менее гидрофобны. Степень этого свойства характеризуется величиной гидрофобности *H*. Существует общее правило: чем больше атомов углерода содержит сорбент, тем больше времена удерживания. Причина этого в том, что занимаемый связанными неполярными группами объем (т. е. то, что подразумевается под фактической неподвижной фазой) больше в случае длинных цепей, чем в случае более коротких. Удержание прямо пропорционально соотношению объемов неподвижной и подвижной фазы (см. раздел 2.3). На рис. 10.7 показано влияние длины углеводородной цепи на удержание.

Удержание тем сильнее, чем длиннее алкильная часть (C_{18} лучше удерживает, чем C_8), чем выше плотность алкильных цепей (количество групп на nm^2

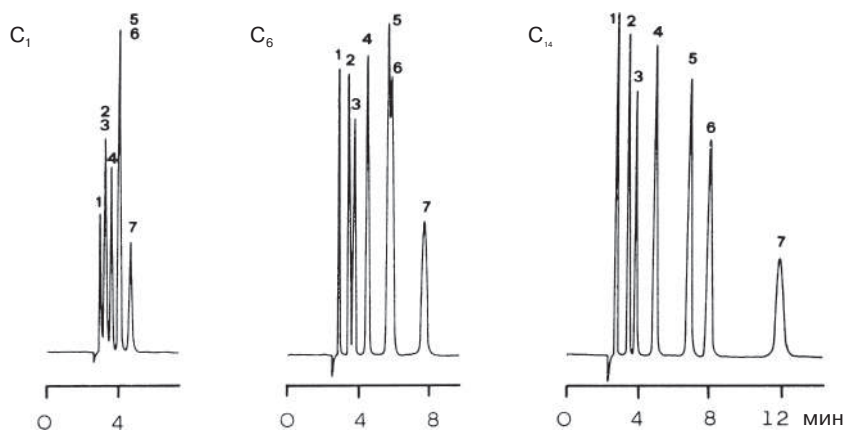


Рис. 10.7. Влияние длины цепи на удержание [печатается с разрешения из работы G. E. Berendsen and L. De Galan, *J. Chromatogr.*, **196**, 21 (1980)]. Условия: подвижная фаза метанол — вода (60:40). Пики: 1 — ацетон, 2 — *n*-метоксифенол, 3 — фенол, 4 — *m*-крезол, 5 — 3,5-ксиленол, 6 — анизол, 7 — *p*-фенилфенол



поверхности), чем выше степень эндкеппинга, чем толще органическая часть неподвижной фазы (полимерные слои удерживают лучше мономерных) или, как итог, чем больше содержание углерода, определяемого элементным анализом.

Сильное удерживание требует больше времени для элюции или высокого процента растворителя V . Неподвижные фазы с сильным удерживанием подходят для разделения полярных образцов, которые, даже несмотря на высокую долю воды в элюенте, слабо удерживаются на фазе с низким содержанием углерода. Неполярные соединения лучше анализировать на сорбентах с низким содержанием углерода. В этом случае время удерживания будет меньше и меньше органического растворителя в подвижной фазе.

Еще одна особенность обращенно-фазовых сорбентов — *силанольная активность*. Ранее в разделе 7.5 уже упоминалось о том, что невозможно блокировать все силанольные группы на поверхности силикагеля вследствие стерических причин. Все равно останутся свободные силанольные группы, которые эндкеппируют или стерически экранируют. Различные сорбенты, продаваемые разными фирмами, существенно отличаются своей силанольной активностью, поскольку не все из них эндкеппированы. Активные силанольные группы в большинстве случаев мешают в разделении аналитов, особенно основных. Несмотря на это, такие сорбенты могут быть весьма эффективны при разделении сильно гидрофильных (полярных) соединений. У силанольной активности есть две особенности: неионизированные силанольные группы в кислой среде могут выступать в качестве доноров водородных связей с определенным показателем кислотности A , при этом ионизированные силанольные группы в нейтральной или основной средах способствуют катионному обмену C .

Кроме того, обращенно-фазовые сорбенты обладают основностью B , т.е. способностью быть акцептором водородных связей (возможно, благодаря сорбированной воде), и стерическим сопротивлением S к громоздким аналитам.

У каждого доступного в продаже обращенно-фазового сорбента есть ряд характеристик H , A , B , C , S . Их можно вычислить¹, свести в таблицу и сравнить². Эти параметры помогают выявить сходство или различия свойств колонок. Разницу F_s между двумя сорбентами можно определить по коэффициенту соответствия колонок:

$$F_s = \sqrt{[12,5(H_2 - H_1)]^2 + [100(S_2 - S_1)]^2 + [30(A_2 - A_1)]^2 + [143(B_2 - B_1)]^2 + [83(C_2 - C_1)]^2}$$

Два сорбента схожи по своим свойствам (и могут заменить друг друга), если $F_s \leq 3$, и различны, если F_s имеет большие значения. Во втором случае, если колонка с сорбентом 1 не дает оптимального разделения, можно использовать колонку с сорбентом 2.

Параметр C невозможно свести в одну таблицу, поскольку для разных сред (например, для кислой с pH 2,8 и нейтральной с pH 7,0) он разный. Если образец не содержит кислот и/или ионизированных оснований, то параметры B и C утрачивают свой смысл и в вычисления F_s не включаются.

¹ L. R. Snyder *et al.*, *J. Chromatogr. A.*, **1057**, 49 (2004).

² L. R. Snyder, J. W. Dolan and P. W. Carr, *J. Chromatogr. A.*, **1060**, 77 (2004); the same, *Anal. Chem.*, **79**, 3254 (2007); L. R. Snyder and R. E. Majors, *LC GC Eur.*, **18**, 196 (2005) or *LC GC North Am.*, **22**, 1146 (2004).

Задача 28

Определить значения F_s для сорбентов Prontosil C18 AQ и Platinum EPS C18, сравнить их с октадециловым сорбентом Genesis AQ, если подвижная фаза закислена. Параметры сорбентов следующие (взято из статьи Snyder, Dolan and Carr, *J. Chromatogr. A*¹³):

	Genesis AQ	Prontosil C18 AQ	Platinum EPS C18
H	0,961	0,973	0,614
S	−0,037	0,011	−0,162
A	−0,155	−0,057	0,330
B	0,008	0,006	0,018
C (2,8)	0,061	0,125	0,720
C (7,0)	0,234	0,288	1,730

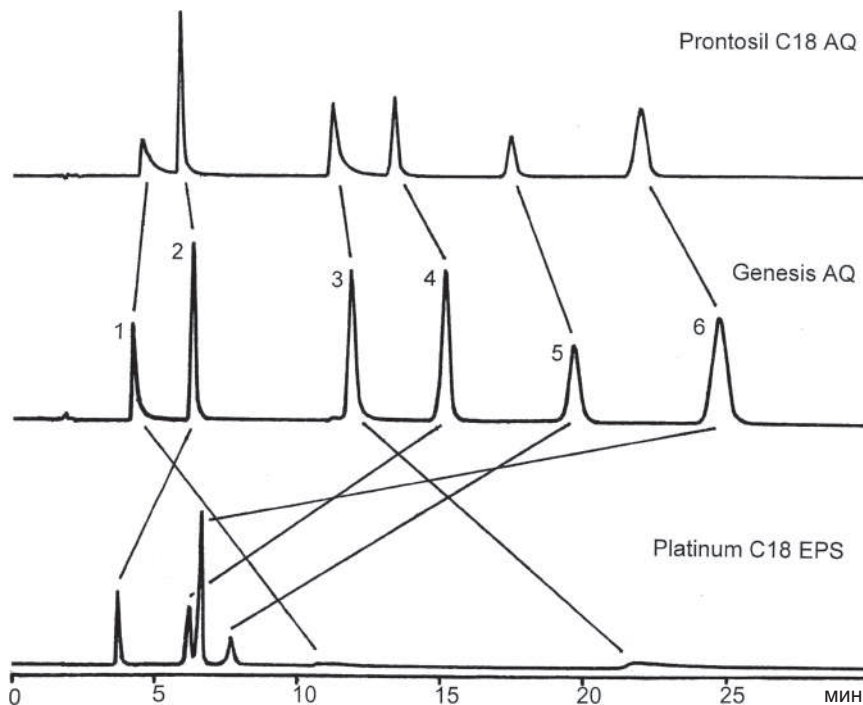


Рис. 10.8. Разделение гидрофильных соединений на трех разных колонках C18 [печатается с разрешения из статьи M. R. Euerby and P. Petersson, *J. Chromatogr. A*, **994**, 13 (2003)]. Сорбенты: Prontosil C18 AQ (похожая, $F_s = 7,7$), Genesis AQ (колонка сравнения), Platinum EPS C18 (отличается, $F_s = 58$). Условия: колонки 150×4,6 мм, подвижная фаза KH_2PO_4 , pH 2,7 в смеси вода — метанол (96,7:3,3), скорость подвижной фазы 1 мл/мин, температура колонки 60 °C, УФ, 210 нм. Пики: 1 — никотин, 2 — бензиламин, 3 — прокаинамид, 4 — тербуталин, 5 — сальбутамол, 6 — фенол

Решение

Так как подвижная фаза кислая, то в формулу подставляем значения, соответствующие С (2,8).

Сравним Prontosil C18 AQ (колонка 1) с Genesis AQ (колонка 2):

$$F_s = \sqrt{[12,5(0,973 - 0,961)]^2 + [100(0,011 + 0,037)]^2 + [30(-0,057 + 0,155)]^2 + [143(0,006 - 0,008)]^2 + [83(0,125 - 0,061)]^2} = 7,7.$$

Аналогичным образом рассчитаем параметр F_s при сравнении колонок Platinum EPS C18 и Genesis AQ и получим значение 58.

Колонки Prontosil и Genesis хотя и не одинаковы, но очень похожи. Если одной из них нет в наличии, то ее можно легко заменить другой. Колонка Platinum, напротив, очень сильно отличается от двух других, поэтому ее нельзя рассматривать в качестве альтернативы. Хотя во время валидационных тестов на селективность было бы интересно проанализировать образец на этой колонке и посмотреть, все ли пики разделяются.

Результаты этих вычислений подтверждают хроматограммы на рис. 10.8.

F_s — это мера различия двух сорбентов в пятимерном пространстве параметров H , S , A , B и C . Человеку такое пространство очень сложно представить. Наше понимание ограничивается двумя или тремя измерениями. На рис. 10.9 показано распределение некоторых фаз C_8 и C_{18} в двух измерениях — «гидрофобность» и «силанольная активность» (последнее свойство включает в себя два вышеупомянутых параметра A и C). Сорбенты C_8 менее гидрофобны по сравнению с C_{18} и поэтому преимущественно располагаются в левой части диаграммы, а октадециловые сорбенты — в правой.

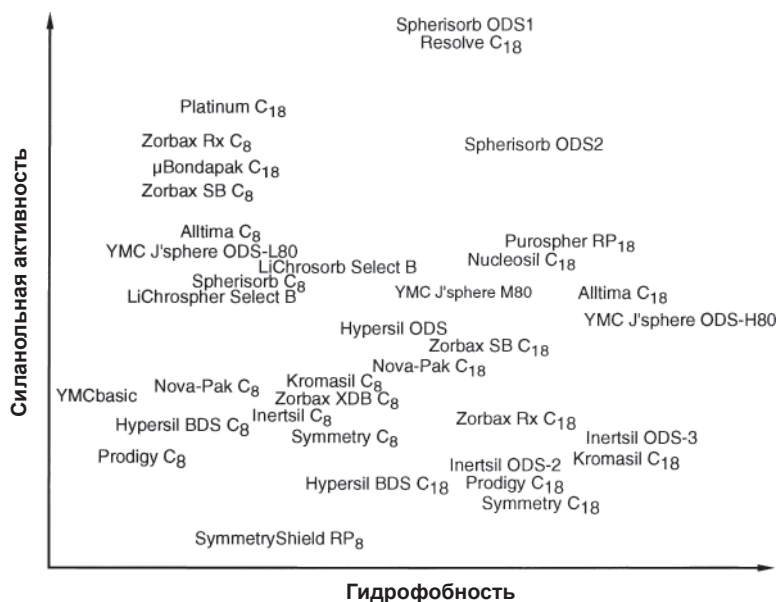


Рис. 10.9. Селективные свойства фаз C_8 и C_{18} (заимствовано с разрешения Waters)

групп на силикагеле с низким содержанием ионов металлов находятся в нижней части диаграммы. «Старые» сорбенты, менее подходящие для разделения оснований и находящиеся в голове диаграммы, могут обладать другой селективностью. Такая двумерная диаграмма может оказаться весьма полезной, но концепция коэффициента соответствия колонок F_s все же более всеобъемлюща.

Разделение оснований рекомендуется проводить на сорбентах, произведенных специально для таких соединений¹. В противном случае может быть устойчивое уширение задних фронтов пиков, которое вполне возможно подавить различными добавками в элюент, но этот способ не такой изящный. Пример изображен на рис. 10.10.

Равновесие между подвижной фазой и сорбентом в ОФ-ЖХ устанавливается быстро, поэтому проведение градиентных разделений не вызывает затруднений. Время, требуемое на уравнивание между анализами, можно определить экспериментально. Но в большинстве случаев, чтобы уравновесить колонку между разделениями и получить воспроизводимые результаты, достаточно пяти колоночных объемов свежего элюента.

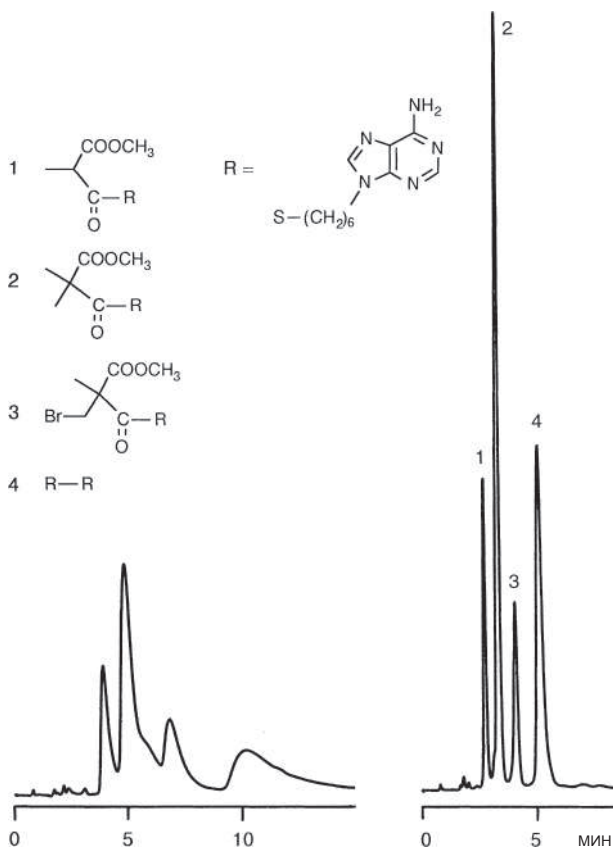


Рис. 10.10. Сорбенты для основных соединений. Условия: образец — производные аденина, колонка 250×4 мм, сорбент слева LiChrospher 100 RP-18, 5 мкм (обладающий высокой эффективностью разделения и хорошей симметрией пиков для нейтральных соединений), справа LiChrospher 60 RP-Select B, 5 мкм, подвижная фаза вода — метанол (25:75), скорость 1,5 мл/мин, длина волны 260 нм

¹ D. V. McCalley, *J. Sep. Sci.*, **26**, 187 (2003).



10.5. Разработка методики в обращенно-фазовой хроматографии¹

В обращенно-фазовой хроматографии обычно начинают разработку методики с градиента 10–100 %В. Этот метод изложен в разделе 18.2. Далее в этом разделе описан план с рекомендуемой последовательностью изменений различных параметров. Например, прежде чем менять колонку, целесообразнее попробовать другой растворитель В.

План для неионных образцов²

Используйте сорбент C_8 или C_{18} , а в качестве подвижной фазы — водный ацетонитрил без буфера. Если можно регулировать температуру, то проводите эксперименты примерно при 40 °С, если нельзя, то при комнатной температуре.

1. Меняйте %В или диапазон градиента таким образом, чтобы коэффициент удерживания находился в интервале от 1 до 10 (или от 1 до 20 для сложных образцов). Если образец разделяется плохо, изменяйте селективность в следующем порядке:
2. Поменяйте органический растворитель В.
3. Используйте смесь органических растворителей в качестве элюента В.
4. Поменяйте сорбент (лучше взять сорбент, который существенно отличается по своим свойствам от предыдущего, см. раздел 10.4). Возможно, стоит снова начать с пункта 1.
5. Измените температуру.
6. Оптимизируйте физические параметры: размеры колонки, размер частиц или скорость потока.

План для ионных образцов³

Используйте сорбент C_8 или C_{18} , подходящий для основных аналитов. Подвижная фаза состоит из буфера с pH 2,5 и метанола, если возможно, то при 40 °С.

1. Измените %В или диапазон градиента. Если образец разделяется плохо, то:
2. (а) измените pH или
(б) перейдите к ион-парной хроматографии.
3. Измените %В 4.
4. Поменяйте органический растворитель:
5. (а) измените pH или
(б) измените pH и ион-парный реагент.
6. Измените температуру.
7. Поменяйте стационарную фазу на фенильную или циано.
8. Оптимизируйте физические параметры.

¹ U.D. Neue *et al.*, Method Development in RP Chromatography, in: I. D. Wilson, ed., *Bioanalytical Separations*, Elsevier, Amsterdam, 2003, pp. 185–214.

² L. R. Snyder, J. J. Kirkland and J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, Wiley — Interscience, 2nd ed., 1997, p. 253.

³ L. R. Snyder, J. J. Kirkland and J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, Wiley — Interscience, 2nd ed., 1997, p. 315. Также см. J. J. Kirkland, *LC GC Mag.*, **14**, 486 (1996).

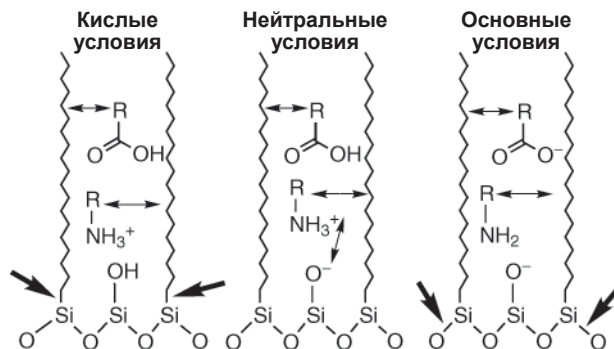


Рис. 10.11. Возможный способ взаимодействия между образцом и обращенно-фазовым сорбентом. Горизонтальная двояконаправленная стрелка указывает на гидрофобные взаимодействия, наклонная стрелка обозначает ионные взаимодействия. Стрелки, выделенные жирным, указывают на возможные места гидролиза: в сильно кислых условиях гидролизует связь Si-C, в то время как при высоком pH силикагель растворяется

Если после выполнения всех этапов предложенной схемы разделение осталось неприемлемым, необходимо перейти к другому методу (ионообменной, адсорбционной, эксклюзионной хроматографии).

Ранее уже упоминалось, что сложности могут возникнуть с основными аналитами¹. Рисунок 10.11 объясняет причину этих сложностей. Если основание заряжено и, кроме того, присутствуют доступные силанольные группы (нейтральные условия), то механизм удерживания смешанный с гидрофобными и ионными взаимодействиями. Это приводит к уширению задних фронтов пиков и нестабильному разделению. В некоторых случаях смешанный механизм можно подавить, используя буферные элюенты. Если это не помогает, то рекомендуется работать в кислых условиях, поскольку многие сорбенты неустойчивы при высоких значениях pH. Наиболее перспективными являются специально разработанные стационарные фазы для основных аналитов (рис. 10.10). Они либо содержат небольшое количество силанольных групп, либо эти группы тщательно экранированы. Такие сорбенты сделаны на основе высокочистого силикагеля с очень низкой концентрацией катионов тяжелых металлов или содержат полярные включенные группы. Кислотные аналиты не вызывают таких затруднений, так как для них не характерны ионные взаимодействия с сорбентом.

Не стоит забывать общее правило: ионные образцы гидрофильны, поэтому они элюируются очень рано. При низких pH ионизированы основные соединения, при высоких pH — кислотные.

10.6. Приложения

Водные растворы биологического, фармацевтического происхождения, напитки и т.д. часто анализируют методом ВЭЖХ. Поскольку вода — самый

¹ D. V. McCalley, *LC GC Eur.*, **12**, 638 (1999) or *LC GC Mag.*, **17**, 440 (1999).

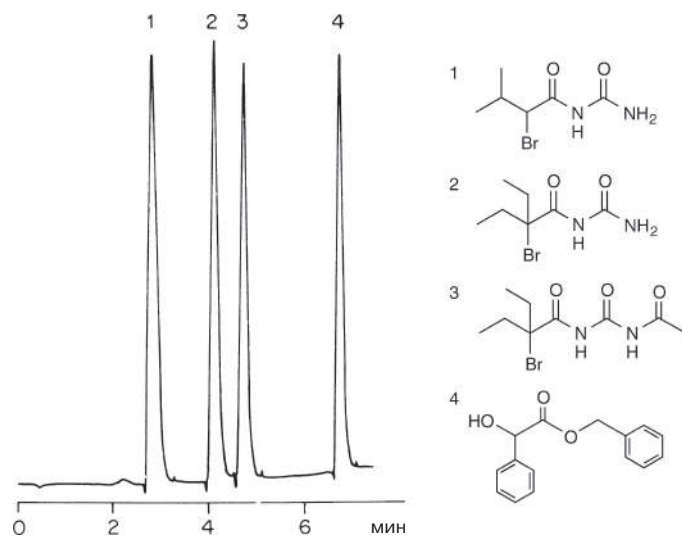


Рис. 10.12. Хроматограмма разделения транквилизаторов (печатается с разрешения Hewlett-Packard). Условия: колонка 25 см×4 мм, сорбент LiChrosorb RP-8, 10 мкм, подвижная фаза 30 % ацетонитрил, градиент: 30–90 % ацетонитрила за 16 мин, длина волны 254 нм. Пики: 1 — бромурал, 2 — бро-мэтилацетилмочевина, 3 — ацетобромэтилацетилмочевина, 4 — бензиловый эфир миндальной кислоты

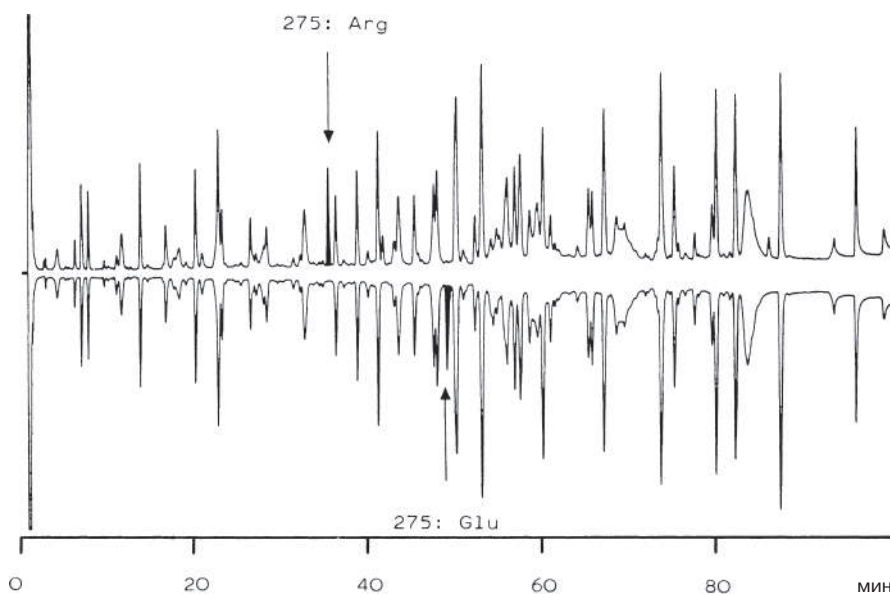


Рис. 10.13. Разделение трипсинового гидролизата активатора плазминогена тканевого типа (печатается с разрешения из статьи R.L. Garnick, N.J. Solli and P.A. Para, *Anal. Chem.*, **60**, 2546 (1998)). Условия: колонка Nova Pak C18, 5 мкм, подвижная фаза 50 мМ фосфат натрия, pH 2,8 — ацетонитрил, скорость потока 1 мл/мин, ступенчатый градиент, длина волны 210 нм. Верхняя хроматограмма — нормальный белок с аргинином в положении 275; нижняя хроматограмма — мутировавший белок с глутаминовой аминокислотой в положении 275

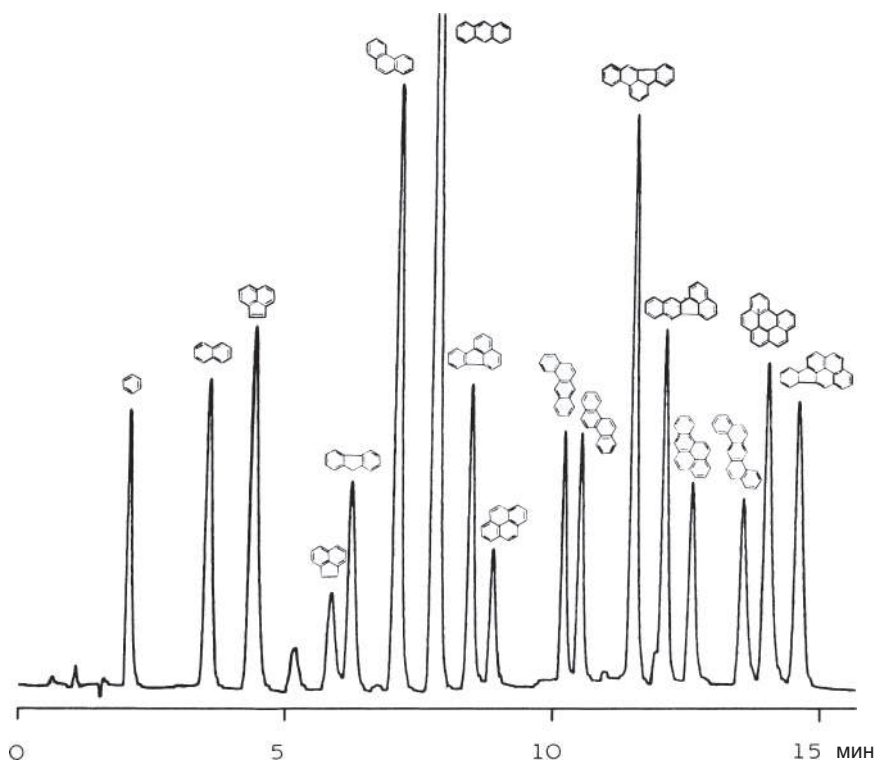


Рис. 10.14. Разделение полициклических ароматических углеводородов (печатается с разрешения Separations Group). Условия: колонка Vydac TP C₁₈, 5 мкм, 15 см × 4,6 мм, подвижная фаза вода — ацетонитрил, линейный градиент 50–100 % ацетонитрила от 3 до 10 мин, скорость элюента 1,5 мл/мин, длина волны 254 нм

слабый элюент, то и водные растворы можно анализировать без специальной пробоподготовки, хотя настоятельно рекомендуется не пренебрегать стадиями фильтрования и центрифугирования. На рис. 1.2 изображен анализ 10 мкл кофеина. На рис. 10.12 приведен дополнительный пример. Таблетки транквилизатора растворили в воде, раствор отфильтровали и проанализировали. Другие методы анализа этого лекарственного средства занимают довольно много времени.

На рис. 10.13 дан пример прекрасной эффективности ОФ ВЭЖХ в биотехнологическом исследовании. На хроматограмме изображено разделение трипсинового гидролизата нормальной и мутантной формы активатора плазминогена тканевого типа. Этот белок, массой приблизительно 67000 Да, состоит из 527 аминокислот. Мутантный белок отличается одной аминокислотой, и это приводит к изменению времени удерживания специфического фрагмента.

Однако методом обращенно-фазовой хроматографии разделяют не только полярные соединения. Например, 17 полициклических ароматических углеводородов, загрязняющих окружающую среду, можно проанализировать

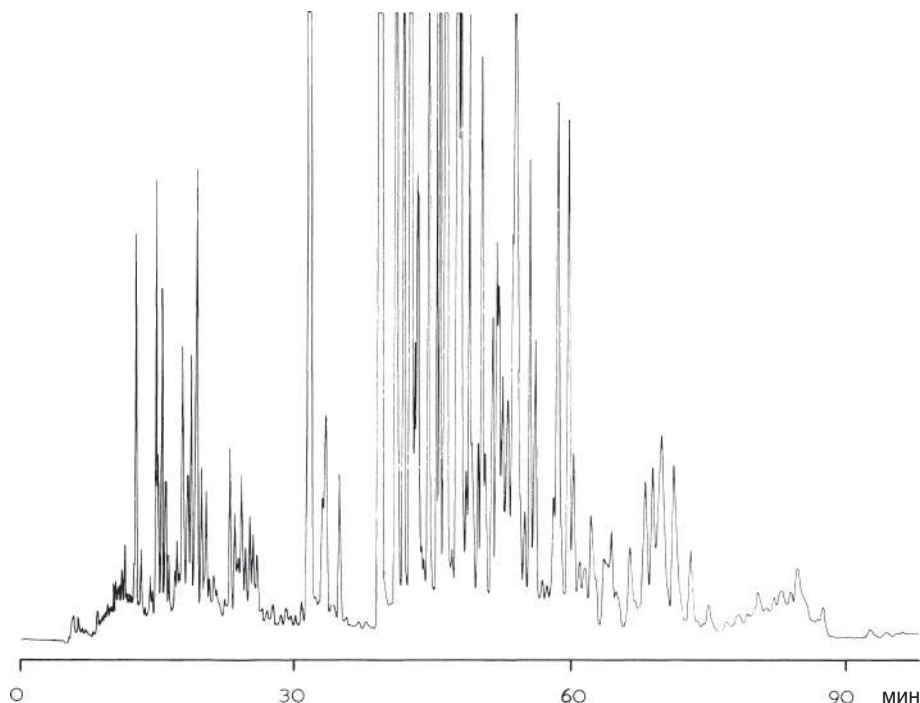


Рис. 10.15. Разделение фракции нефти (Beckman). Условия: 5 мкл образца фракции нефти растворили в 10 мл ацетонитрила, четыре колонки 25 см × 4,6 мм, сорбент Ultrasphere-ODS, 5 мкм, подвижная фаза вода — ацетонитрил, 60 % ацетонитрил в течение 30 мин, затем 80 % ацетонитрил, скорость потока 1 мл/мин, температура колонки 42 °С, длина волны 254 нм

с помощью ОФ ЖХ за 15 мин (рис. 10.14). На рис. 10.15 показан пример разделения с хорошим разрешением сложной смеси компонентов ароматической фракции нефти, которую обычно анализировали капиллярной газовой хроматографией.

Дополнительные примеры разделения образцов методом ОФ ВЭЖХ приведены на рис. 1.1, 1.2, 2.12, 2.20, 2.21, 2.24, 2.27, 4.8, 6.5, 6.7, 6.11, 6.13, 6.14, 6.19, 7.5, 8.2, 15.126, 18.12, 18.13, 18.15, 19.9, 21.5, 22.5, 23.1, 23.3, 23.5 и 23.10.

10.7. Хроматография гидрофобных взаимодействий¹

В обращенно-фазовой хроматографии взаимодействие между образцом и сорбентом настолько прочное, что обычный водный элюент без добавления органического растворителя слишком слаб. В некоторых случаях, когда речь идет

¹ K. O. Eriksson, in *Protein Purification*, J. C. Janson and L. Ryden, eds., Wiley-Liss, New York, 2nd ed., 1998, pp. 283–309.

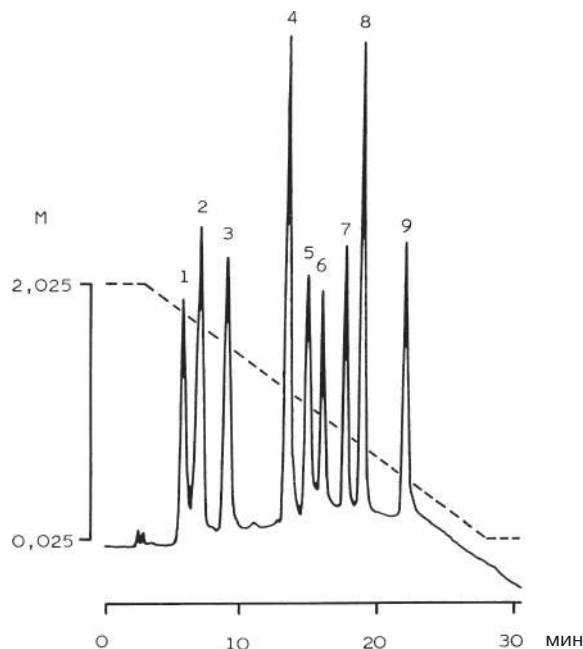


Рис. 10.16. Разделение пептидной смеси с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий (печатается с разрешения из статьи A. J. Alpert, *J. Chromatogr.*, **444**, 269 (1998)). Условия: колонка 20 см×4,6 мм, сорбент полипропиласпартамид, 5 мкм, подвижная фаза 2 М сульфат аммония с 0,025 М фосфатом натрия pH 6,5—0,025 М фосфат натрия pH 6,5, линейный градиент: диапазон указан на рисунке, скорость подвижной фазы 1 мл/мин, длина волны 220 нм. Пики: 1 — вещество P (1–9), 2 — [Arg⁸]-вазопрессин, 3 — окситоцин, 4 — вещество P, свободная кислота, 5 — [Trp⁸]-вещество P, 6 — вещество P, 7 — [Tyr¹¹]-соматостатин, 8 — соматостатин, 9 — [Tyr¹]-соматостатин

о разделении белков, органическую подвижную фазу не рекомендуют использовать, поскольку есть риск денатурации белка, влекущий за собой потерю биологической активности.

Чисто водная подвижная фаза пригодна только для разделений на слабо гидрофобных сорбентах. Такие сорбенты содержат от 1/10 до 1/100 от углерода, привитого обычным обращенно-фазовым сорбентам. Низкое содержание углерода достигается путем незначительного покрытия силикагеля короткоцепочечными группами, такими как бутильные или фенильные. Белки удерживаются на сорбенте, когда в элюенте большая концентрация соли, например 1 М или больше. Как только концентрация соли падает, белки начинают элюировать. Это очень мягкий способ очистки белков, один из вариантов обращенно-фазовой хроматографии, известный как хроматография гидрофобных взаимодействий ХГВ (HIC, рис. 10.16).

В табл. 10.1 показано, что состав элюента существенно влияет на удержание.

Еще один пример изображен на рис. 7.4.



Таблица 10.1. Оптимизация разделений методом хроматографии гидрофобных взаимодействий¹

Наблюдение	Рекомендации
Слабое удерживание белка	<p>Увеличить концентрацию соли.</p> <p>Использовать другую соль, которая увеличит поверхностное натяжение.</p> <p>Установить pH примерно равным изоэлектрической точке белка.</p> <p>Использовать сорбент с короткими углеводородными цепями и/или с низкой плотностью лигандов, т. е. сорбент с меньшим фазовым отношением.</p>
Низкая селективность	<p>Поменять соль.</p> <p>Использовать добавки, влияющие на селективность белка, например, ингибиторы или аллостерические эффекторы.</p>
Белок не элюирует	<p>Снизить концентрацию соли, если она высокая, или увеличить, если низкая.</p> <p>Использовать другую соль, которая снизит поверхностное натяжение.</p> <p>Добавить в элюент амин или другой агент для снижения силанофильных взаимодействий.</p> <p>Установить pH элюента, более отличающийся от изоэлектрической точки белка.</p> <p>Использовать сорбент с более длинным лигандом и/или с более высокой плотностью углеводородных цепочек, т. е. с увеличенным фазовым соотношением</p>

¹ Печатается с разрешения из статьи W.R. Melander, D. Corradini and C. Horváth, *J. Chromatogr.*, **317**, 67 (1985).

ГЛАВА II

ХРОМАТОГРАФИЯ НА ХИМИЧЕСКИ ПРИВИТЫХ ФАЗАХ

II.1. Введение

В разделе 7.5 описана химическая модификация силикагеля. Полученные таким путем сорбенты могут иметь любую полярность. Ввиду своей важности неполярные сорбенты уже обсуждались в главе 10. Здесь же будут рассмотрены полярные и среднеполярные стационарные фазы, а также описаны самые популярные типы сорбентов.

В большинстве случаев разделения на химически привитых фазах аналогичны разделениям на силикагеле. Хотя иногда, в зависимости от типа сорбента, они могут отличаться селективностью, и хроматографисту следует это учитывать. У химически привитых сорбентов есть некоторые преимущества перед силикагелем:

- а) их можно использовать как в нормально-фазовой, так и в обращеннофазовой хроматографии;
- б) в элюент не нужно добавлять дезактиватор;
- в) растворитель можно менять вне зависимости от элюотропного ряда, по следующее уравнивание колонки протекает достаточно быстро;
- г) можно использовать градиентное элюирование.

II.2. Свойства некоторых стационарных фаз

Диол

К поверхности этой фазы химически привиты ОН-группы, благодаря которым этот сорбент похож на силикагель. Он подходит для разделения тех молекул, с которыми можно образовать водородные связи. Такой сорбент пригоден, в частности, для разделения тетрациклинов, стероидов, органических кислот и биополимеров (белков). На рис. 11.1 изображена хроматограмма разделения неионного полярного поверхностно-активного вещества (ПАВ), состоящего из смеси полиэтоксиполифенолов. Олигомеры различаются количеством этоксигрупп. У Triton X-100 средняя длина цепи примерно $n = 10$.

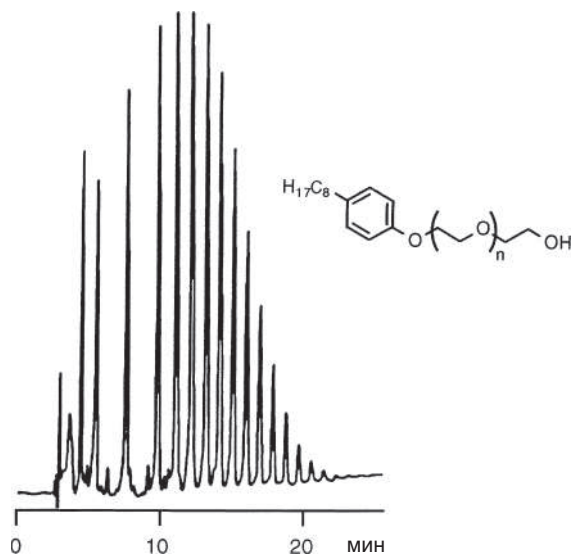


Рис. 11.1. Разделение неионного ПАВ на диольной фазе (печатается с разрешения Supelco). Условия: образец Triton X-100 со средней длиной цепи $n = 10$, колонка $250 \times 4,6$ мм, сорбент Supelcosil LC-Diol, 5 мкм, скорость подвижной фазы 1 мл/мин, нелинейный градиент от 15,5 % хлористого метилена + 3 % метанола в гексане до 40 % хлористого метилена + 10 % метанола в гексане за 35 мин, температура колонки 35°C , УФ, 280 нм

Нитрильная (циано)

Это слабополярный сорбент, поэтому разделения на нем обычно аналогичны разделениям на силикагеле. Однако при одной и той же подвижной фазе коэффициент k на нитрильном сорбенте ниже¹. Его также можно использовать как обращенно-фазовый сорбент, но по сравнению с фазами C_8 и C_{18} он обладает меньшим удерживанием². Эта неподвижная фаза особенно селективна к молекулам с двойными связями и трициклическим антидепрессантам. Разделение последних изображено на рис. 11.2.

Амино

Анализ сахаров и гликозидов — классический вариант использования аминофаз (рис. 11.3). Аминогруппы, будучи основанием и кислотой Бренстеда, в связывании водорода могут играть двоякую роль — акцептора и донора протонов. Органические и неорганические анионы (ацетаты, акрилаты, гликолаты, формиаты, нитриты, бромиды, нитраты, иодаты, дихлорацетаты) можно

¹ Пример приведен в работе Н. Pfander, Н. Schurtenberger and V.R. Meyer, *Chimia*, **34**, 179 (1980).

² D. H. Marchand *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **1062**, 57 (2005).

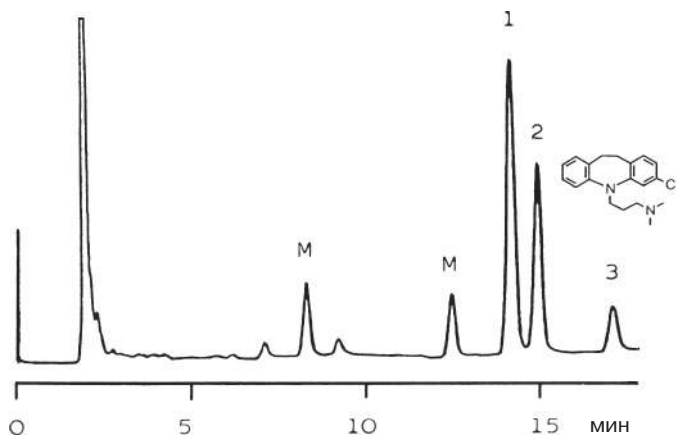


Рис. 11.2. Разделение трициклических антидепрессантов на нитрильной фазе (печатается с разрешения из статьи G. L. Lensmeyer, D. A. Wiebe and B. A. Darcey, *J. Chromatogr. Sci.*, **29**, 444 (1991)). Условия: образец — экстракт сыворотки, полученной у пациента, принимающего кломипрамин, колонка $250 \times 4,6$ мм, сорбент Zorbax Суанопоргул, 5–6 мкм, подвижная фаза вода — ацетонитрил — уксусная кислота — *n*-бутиламин (600:400:2,5:1,5), скорость подвижной фазы 1,2 мл/мин, температура колонки 45°C , УФ, 254 нм. Пики: М — метаболиты кломипрамина, 1 — тримипрамин (внутренний стандарт), 2 — дез-метилкломипрамин, 3 — кломипрамин

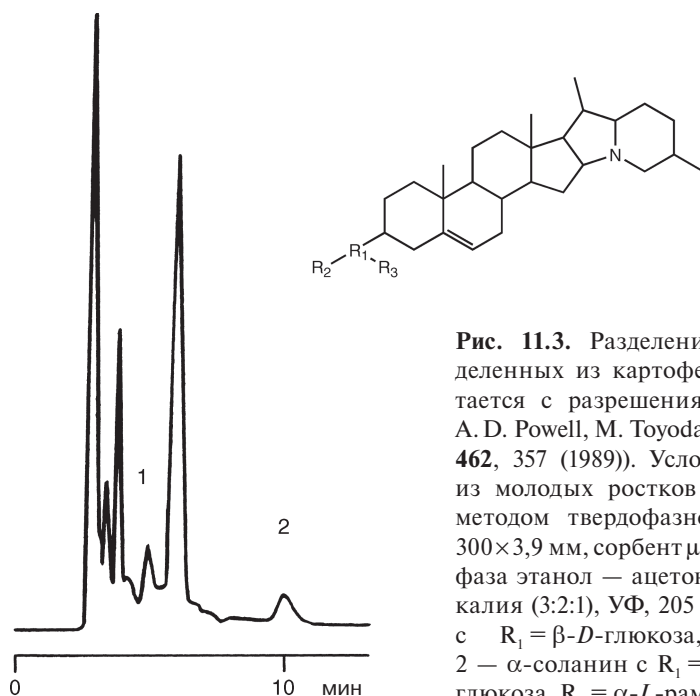


Рис. 11.3. Разделение гликоалкалоидов, выделенных из картофеля, на аминофазе (печатается с разрешения из статьи K. Kobayashi, A. D. Powell, M. Toyoda and Y. Saito, *J. Chromatogr.*, **462**, 357 (1989)). Условия: образец — экстракт из молодых ростков картофеля, полученный методом твердофазной экстракции, колонка $300 \times 3,9$ мм, сорбент μ Bondapak NH_2 , подвижная фаза этанол — ацетонитрил — дигидрофосфат калия (3:2:1), УФ, 205 нм. Пики: 1 — α -чаконин с $\text{R}_1 = \beta\text{-D-глюкоза}$, $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \alpha\text{-L-рамноза}$, 2 — α -соланин с $\text{R}_1 = \beta\text{-D-галактоза}$, $\text{R}_2 = \beta\text{-D-глюкоза}$, $\text{R}_3 = \alpha\text{-L-рамноза}$



Рис. 11.4. Разделение нитрата и бромида из экстракта капустного листа на аминофазе. Условия: образец — 20 мкл экстракта, полученного после гомогенизации, осаждения белков и фильтрации, колонка $250 \times 3,2$ мм, сорбент LiChrosorb NH_2 , 5 мкм, подвижная фаза 1 % KH_2PO_4 в воде, доведенная H_3PO_4 до pH 3, скорость подвижной фазы 1 мл/мин, УФ, 210 нм. Пики: 1 — нитрил (образовавшийся из нитрата в результате пробоподготовки), 2 — бромид, 3 — нитрат

разделить на аминофазе, элюируя фосфатным буфером с $\text{pH} \approx 3$ ¹. На рис. 11.4 изображен пример разделения экстракта капустного листа, содержащего примерно 1000 м.д. нитрата и 300 м.д. бромида (после обработки почвы метилбромидом).

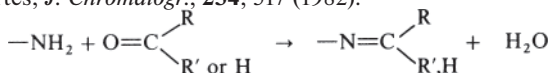
NH_2 -группа легко окисляется, поэтому следует избегать образования перекисей (в диэтиловом эфире, диоксане или тетрагидрофуране). Кетоны и альдегиды, взаимодействуя с аминогруппой, образуют основание Шиффа². По сравнению с другими сорбентами аминофаза легко подвергается гидролизу. Чтобы этого избежать, рекомендуется использовать предколонку (колонку-поглотитель)³.

В водных кислых растворах аминогруппа ведет себя как слабый анионообменник, образуя первичный ион аммония RNH_3^+ . Следовательно, в водных элюентах удерживание зависит от величины pH. Чтобы регенерировать колонку, ее промывают 0,1 М раствором аммония.

Нитро

Эта фаза селективна к ароматическим соединениям. Ее эффективность проиллюстрирована на рис. 11.5. На нитрофазе анализировали обычную каменноугольную смолу (остаток после дистилляции коммерчески доступной высокотемпературной смолы). В результате на хроматограмме можно различить 90 компонентов образца, включая полициклические ароматические углеводороды и сопутствующие гетероциклические и олигомерные системы. Двадцать четыре из них удалось выделить, идентифицировать с помощью характеристических УФ-спектров, сравнив их со спектрами известных веществ.

¹ U. Leuenberger, R. Gauch, K. Rieder and E. Baumgartner, *J. Chromatogr.*, **202**, 461 (1980); H. J. Cortes, *J. Chromatogr.*, **234**, 517 (1982).



Как восстановить колонку с аминофазой, которая в результате взаимодействия с ацетоном потеряла эффективность, описано в статье D. Karlesky, D. C. Shelly and I. Warner, *Anal. Chem.*, **53**, 2146 (1981).

³ B. Porsch and J. Krátká, *J. Chromatogr.*, **543**, 1 (1991).

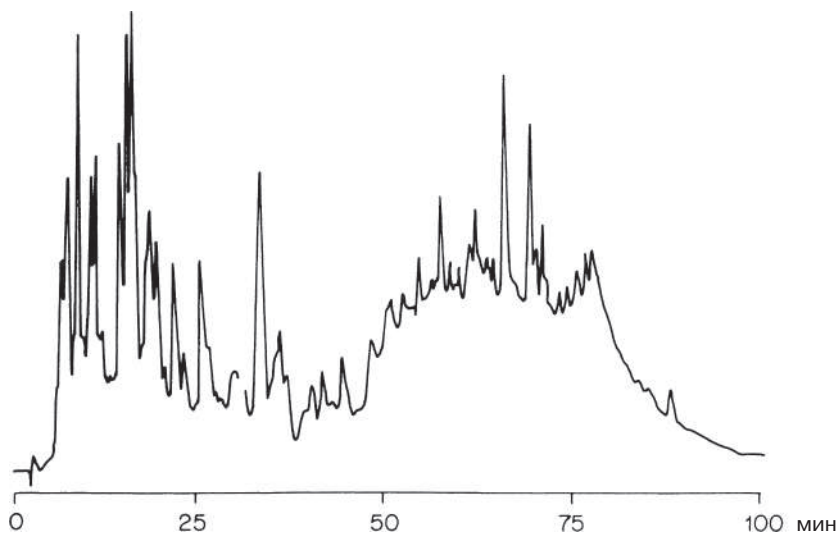


Рис. 11.5. Разделение обычной каменноугольной смолы на нитрофазе (печатается с разрешения из G. P. Blümer, R. Thoms and M. Zander, *Erdöl Kohle, Erdgas, Petrochem.*, 31, 197 (1978)). Условия: две колонки 200×4 мм с предколонкой, сорбент Nucleosil NO₂, 5 мкм, подвижная фаза гексан-хлороформ, градиентное разделение, УФ, 300 нм, чувствительность 1 a.u.f.s. (absolute unit full scale — абсолютная (оптическая) единица на полную шкалу), после 30 минут анализа чувствительность 0,4 a.u.f.s

11.3. Хроматография гидрофильных взаимодействий¹

Хроматография гидрофильных взаимодействий (ГИХ) позволяет разделять очень полярные вещества в нормально-фазовом режиме. Стационарной фазой, собственно, является вода, которая в случае водного элюента адсорбирована на соответствующем сорбенте. Несмотря на то что элюент содержит воду, неполярные молекулы по сравнению с полярными элюируются первыми, как это бывает в классическом варианте нормально-фазовой хроматографии. Сильным компонентом подвижной фазы является вода, буфер или спирт. В роли слабого выступает ацетонитрил, доля которого в ходе анализа понижается (рис. 11.6).

Силикагель; силикагель, привитый диольными, нитрильными, амино- или амидогруппами; силикагель, покрытый гидрофильными полимерами, и различные другие полимеры — все это отличные варианты сорбентов для ГИХ². Все они были специально разработаны для ГИХ, тогда как на «обычных» силикагелях или диольных фазах ГИХ-разделения дают худшие результаты.

С помощью ГИХ хорошо разделяются очень полярные вещества³, например гликозилированные молекулы, которые не удерживаются на обращенной фазе. Их невозможно разделить на классических адсорбентах, поскольку они не элюируются неполярной подвижной фазой.

¹ P. Hemström and K. Irgum, *J. Sep. Sci.*, **29**, 1784 (2006).

² P. Jandera, *J. Sep. Sci.*, **31**, 1421 (2008).

³ Y. Hsieh, *J. Sep. Sci.*, **31**, 1481 (2008).

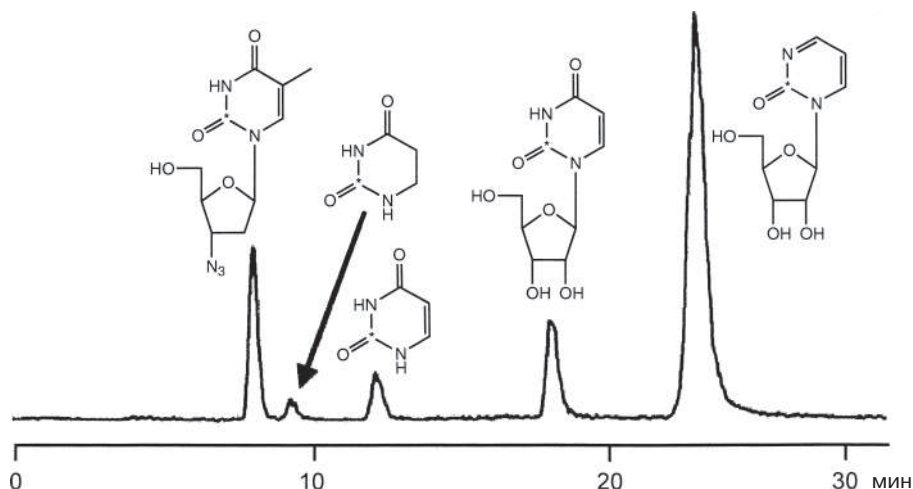


Рис. 11.6. Разделение зебуларина (последний пик) и метаболитов при ГИХ (печатается с разрешения из J. H. Beumer et al., *J. Chromatogr. B*, **831**, 147 (2006)). Условия: образец — плазма крови мышей после пробоподготовки, колонка 250×4,6 мм, сорбент Zorbax NH₂, 5 мкм, подвижная фаза изопропанол (градиент 12–49 %) — 1 М формиат аммония (0,24–1,0 %) — ацетонитрил (88–50 %), скорость подвижной фазы 0,6 мл/мин. Детектор по радиоактивности. Вещества мечены радиоактивным изотопом ¹⁴C в положениях, указанных в формулах звездочкой. Порядок элюции веществ: зидовудин (внутренний стандарт), дигидроурацил, урацил, уридин (все три вещества являются метаболитами) и зебуларин (лекарство)

ГЛАВА 12

ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

12.1. Введение

Ионообменная хроматография (ИОХ) используется для разделения аминокислот с 1956 года¹. С точки зрения затрат и выхода первые разделения можно сравнить с классической колоночной хроматографией на силикагеле или окиси алюминия. Сорбенты для ИОХ в то время были низкого качества, способные работать под небольшим давлением, и на разделение сложных биологических образцов уходило несколько дней. Биохимия испытывала острую необходимость в инструментальном анализе в сочетании с автоматизацией и оптимизацией, что в итоге привело к современным системам ВЭЖХ.

В настоящее время для ионообменной хроматографии разработано большое число сорбентов, способных работать под высоким давлением и обладающих высокой эффективностью. Это дало возможность расширить границы ВЭЖХ. Теперь сложные смеси можно разделять за короткий промежуток времени.

12.2. Принцип ионообменной хроматографии

Принцип ИОХ мало чем отличается от принципа адсорбционной хроматографии. В адсорбционной хроматографии сорбент имеет «активные центры», с которыми взаимодействуют молекулы в непосредственной близости от них, что в большей или меньшей степени определяет специфичность. Молекулы вещества конкурируют с молекулами растворителя за эти центры.

В ИОХ поверхность сорбента заряжена. В качестве источника заряда могут выступать, например, такие группы, как SO_3^{2-} , COO^- , NH_3^+ , NR_3^+ . Заряды нейтрализуются противоионами, находящимися в подвижной фазе. Ионы в элюенте и заряженные молекулы образца конкурируют друг с другом за противоионы на поверхности ионообменника.

На рис. 12.1 показан катионообменник и процесс катионного обмена. Смола, содержащая на своей поверхности SO_3^- -группы, является сильным катионообменником, а COO^- -группы — слабым катионообменником. Анионообменники могут содержать такие группы, как NR_3^+ (сильный анионообменник), NR_2H^+ или NH_3^+ (слабый анионообменник). Анионообменники связываются с отрицательно заряженными ионами.

¹ S. Moore, D. H. Sparkman and W. H. Stein, *Anal. Chem.*, **30**, 1185 (1958).

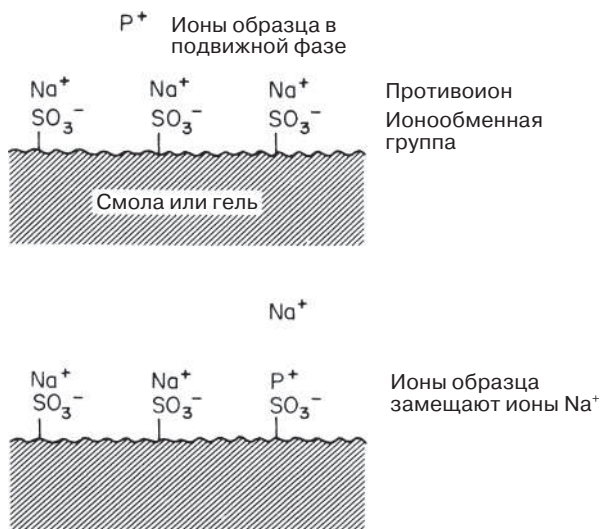


Рис. 12.1. Катионообменник

Как в данных условиях можно воздействовать на конкуренцию между ионами подвижной фазы и образца на поверхности ионообменника, которая является сущностью разделения в ИОХ? Необходимо подобрать оптимальные условия, осторожно меняя:

- тип ионообменника;
- рН подвижной фазы;
- ионную силу (концентрацию) подвижной фазы и
- тип противоиона в подвижной фазе.

Процесс оптимизации разделения часто носит эмпирический характер, но при этом необходимо придерживаться определенных правил. Порядок элюирования соединений зачастую сложно предсказать из-за влияния множества факторов.

12.3. Свойства ионообменников

Эта глава содержит достаточно большое количество используемых в настоящее время аббревиатур. В табл. 12.1 приведены некоторые часто используемые названия. Обратите внимание на первые четыре аббревиатуры, которые обозначают типы ионообменников. Все остальные относятся к той или иной функциональной группе.

Все эти функциональные группы могут быть привиты к органическим полимерам, таким как стиролдивинилбензол, или к силикагелю (необходимо, однако, обратить внимание на стабильность силикагеля с привитыми фазами, см. раздел 7.5). Концентрация лиганда на поверхности сорбента, эквивалентная максимальной ионообменной емкости, составляет примерно 3 мэкв (миллиэквивалента) на 1 г стиролдивинилбензола и примерно 1 мэкв на 1 г силикагеля. Однако силикагель имеет более высокую плотность, поэтому емкости на единицу объема ВЭЖХ-колонки будут примерно одинаковы для обоих типов сорбентов.

Таблица 12.1. Некоторые аббревиатуры, используемые для ионообменников

Аббревиатура	Значение	Тип
SAX	Сильный анионообменник	
WAX	Слабый анионообменник	
SCX	Сильный катионообменник	
WCX	Слабый катионообменник	
AE	Аминоэтил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ WAX
CM	Карбоксиметил	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ WCX
DEA	Диэтиламин	$-\text{NH}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2^+$ WAX
DEAE	Диэтиламиноэтил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2^+$ WAX
DMAE	Диметиламиноэтил	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}(\text{CH}_3)_2^+$ WAX
PEI	Полиэтиленимин	$-(\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n-\text{NH}_3^+$ WAX
QA	Четвертичный амин	$-\text{NR}_3^+$ (где R, например, CH_3) SAX
QAE	Четвертичный аминоэтил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_3^+$ SAX
SA	Остаток сульфокислоты	$-\text{SO}_3^-$ SCX

Сильные анионообменники и катионообменники заряжены во всем диапазоне pH, который обычно используется в ВЭЖХ, и поэтому на емкость сильного ионообменника нельзя повлиять, изменив pH. Такие сорбенты используются для разделения слабых кислот или оснований. Движущей силой разделения является заряд молекул образца, полнота ионизации которых зависит от pH элюента. Молекулы сильных кислот или оснований полностью ионизированы, и поэтому на их удерживание вряд ли может влиять изменение pH подвижной фазы. Следовательно, не имеет смысла пытаться разделить сильные кислоты или основания на сильных ионообменниках. В крайних значениях pH сильные катионообменники находятся в H^+ -форме ($\text{pH} < 2$), а сильные анионообменники в OH^- -форме ($\text{pH} > 10$), при этом они могут катализировать большое число реакций, которые протекают в том числе с образцом (сложные эфиры и пептиды подвергаются гидролизу, альдегиды — диспропорционированию).

Емкость, т.е. удерживание, слабых ионообменников зависит от pH элюента. Слабый катионообменник не диссоциирует, если pH существенно ниже (примерно на 2 единицы) его pK_a (рис. 12.2а). При таком pH ионообменник в H^+ -форме настолько прочно связан с протонами, что они не могут обмениваться с катионами образца. Его емкость близка к нулю. Если же pH подвижной фазы значительно больше pK_a катионообменника, то он полностью диссоциирован. Его ионные группы способны взаимодействовать с молекулами образца (рис. 12.2б) и его емкость максимальна. Если pH близко к значению pK_a , то слабый катионообменник частично диссоциирован (рис. 12.2в). Аналогичные закономерности применимы и к слабым анионообменникам, только их емкость максимальна при низком pH, а при высоком pH — минимальна. Зависимость емкости слабых ионообменников от pH показана на рис. 12.3. В качестве примера были выбраны значения pK_a 4,2 для катионообменника и 9,0 для анионообменника.

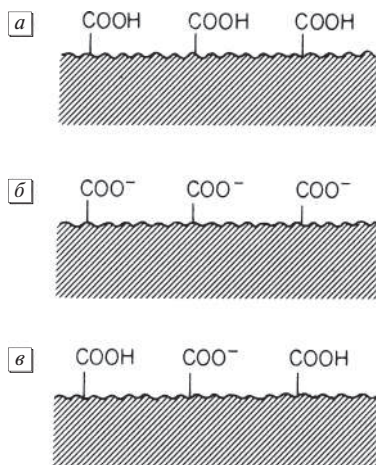


Рис. 12.2. (а) Недиссоциированный катионообменник, (б) полностью диссоциированный катионообменник, (в) частично диссоциированный катионообменник

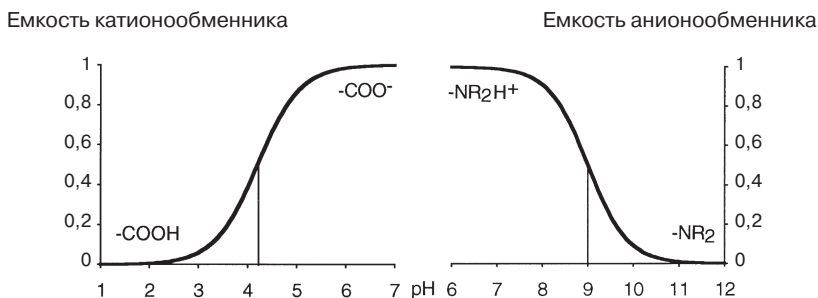


Рис. 12.3. Изменение емкости слабого катионообменника с pK_a 4,2 (слева) и слабого анионообменника с pK_a 9,0 (справа) в зависимости от значения pH

12.4. Влияние подвижной фазы

В ионообменной хроматографии протекают одновременно несколько обратимых реакций, которые контролируются константами равновесия¹.

Катионный обмен зависит от (рис. 12.4):

- а) конкуренции ионов образца P^+ и противоиона буфера Na^+ , выраженной через K_1 ;
- б) ионной силы (концентрации) противоионов;
- в) ионной силы ионов образца;
- г) основности образца, выраженной через K_2 (величина pK_a);
- д) кислотности катионообменника, выраженной через K_3 ;
- е) pH подвижной фазы.

¹ Общее определение константы равновесия: $K = [C][D]/[A][B]$ $A + B \rightarrow C + D$ (квадратные скобки обозначают равновесные концентрации).

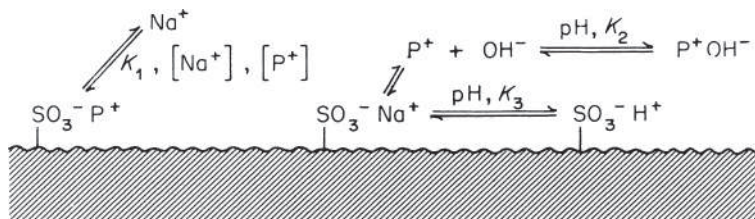


Рис. 12.4. Равновесия, устанавливающиеся в процессе катионного обмена

Из всего вышеперечисленного можно сделать следующие выводы:

а) *увеличение концентрации противоиона приводит к уменьшению времени удерживания* (увеличение концентрации противоионов сдвигает равновесие, характеризующееся константой K_1 , так что связанные с сорбентом ионы P^+ будут переходить в раствор, рис. 12.4);

б) *увеличение pH уменьшает время удерживания на катионообменнике* (повышение pH ведет к увеличению концентрации OH^- , что сдвигает равновесие, характеризующееся константой K_2 , в сторону образования комплекса $\text{P}^+ \text{OH}^-$, который не способен взаимодействовать с ионообменником).

Исключение: при высоких значениях pH увеличивается диссоциация слабого катионообменника, что приводит к увеличению емкости сорбента и большему времени удерживания. Один из этих эффектов будет превалировать.

И наоборот:

в) *при снижении pH уменьшается время удерживания на анионообменнике.*

Исключение: при низких значениях pH увеличивается диссоциация слабого анионообменника, следовательно, удерживание анализируемых ионов увеличивается.

На ионный обмен также влияет выбор типа противоиона. Сила взаимодействия ионов с ионообменниками увеличивается при:

- увеличении заряда иона;
- уменьшении диаметра иона;
- увеличении поляризации иона (выше потенциал смещения электронов под действием электрического поля, т.е. выше диполь-индуцированная емкость). Ионы, которые легко поляризуются, называют *мягкими*, те, которые трудно, — *жесткими*;

г) *элюирующая сила противоионов для катионообменника уменьшается в ряду (с увеличением времени удерживания аналита):* $\text{Ba}^{2+} - \text{Pb}^{2+} - \text{Sr}^{2+} - \text{Ca}^{2+} - \text{Ni}^{2+} - \text{Cd}^{2+} - \text{Cu}^{2+} - \text{Co}^{2+} - \text{Zn}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{Mn}^{2+} - \text{UO}_2^{2+} - \text{Te}^+ - \text{Ag}^+ - \text{Cs}^+ - \text{Rb}^+ - \text{K}^+ - \text{NH}_4^+ - \text{Na}^+ - \text{H}^+ - \text{Li}^+$. Например, при элюировании раствором, содержащим ионы K^+ , аналит будет выходить раньше, чем при элюировании раствором, содержащим ионы Li^+ (точная последовательность элюотропного ряда зависит от используемого катионообменника). K^+ , NH_4^+ , Na^+ , H^+ , как правило, наиболее часто используемые ионы для элюирования с катионообменника;

д) *элюирующая сила противоионов для анионообменника уменьшается в ряду (с увеличением времени удерживания аналита):* цитрат — сульфат — оксалат — тартрат — иодид — борат — нитрат — фосфат — хромат — бромид — роданид — цианид — нитрит — хлорид — формиат — ацетат — фторид — гидроксид — перхлорат. Например, нитрат-анион будет элюировать аналит быстрее



по сравнению с хлорид-анионом, хотя положение анионов в элюотропном ряду также зависит от выбранного анионообменника.

На практике стараются избегать использования анионов, обладающих коррозионным действием, анионов-восстановителей и анионов, которые хорошо поглощают в УФ-области. К наиболее популярным буферам относятся фосфатный и боратный. Нитратный, перхлоратный, сульфатный, ацетатный и цитратный используют реже.

12.5. Особые возможности ионного обмена

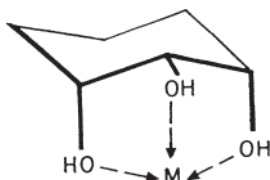
На ионообменные разделения можно повлиять разными способами, а не только влияя непосредственно на сам ионообменный процесс. В таких случаях наблюдается смешанный механизм удерживания, и на этом основана *ион-индуцированная распределительная хроматография*. Она предусматривает разделение аналитов (органических кислот и оснований, углеводов, спиртов и метаболитов) с использованием нескольких механизмов: ионного обмена, ионной эксклюзии, нормально- и обращенно-фазового распределения, лигандного обмена и эксклюзионной хроматографии.

Катионы тяжелых металлов можно разделять в виде комплексов на анионообменниках, например, Fe^{3+} образует устойчивый комплекс с хлорид-ионом:



Реакции лигандного обмена также являются частью ионообменной хроматографии, несмотря на то, что лиганды, принимающие участие в разделении, могут и не быть ионами¹. Для этого на поверхности смолы или геля иммобилизируют ионы меди или никеля. Аминокислоты могут работать как селективные лиганды, а в качестве вытесняющего агента используют ионы аммония².

Углеводы и сахароспирты (полиолы) могут образовывать комплексы с кальцием и другими ионами металлов, если три ОН-группы аналита находятся в аксиально-экваториально-аксиальном положении:



¹ Лигандом может быть молекула или ион, который образует относительно стабильную связь с катионом металла. Например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) является хорошим лигандом для многих катионов. Образование комплекса происходит при взаимодействии неподеленных электронных пар лиганда (донор) и пустых орбиталей ионов металла (акцептор).

² Более подробно см. Immobilized-Metal Affinity chromatography (IMAC или MIC) в книге L. R. Snyder, J. W. Dolan, J. J. Kirkland. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed., 2010. — Прим. пер.

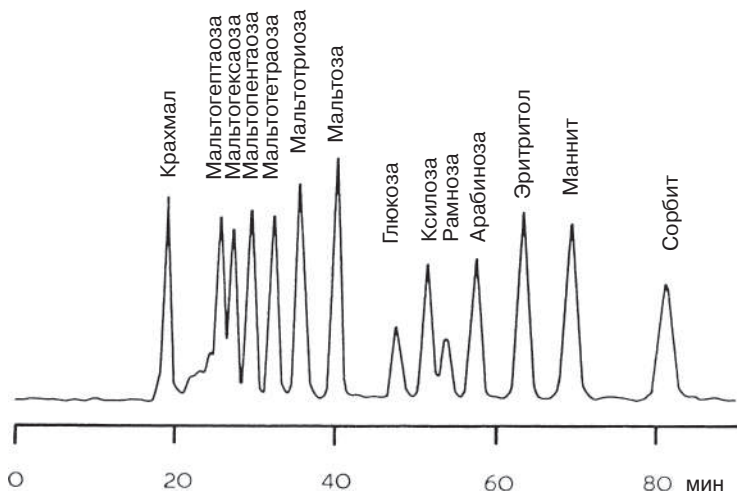


Рис. 12.5. Лиганд-обменная хроматография сахаров и сахароспиртов (печатается с разрешения из статьи J. Schmidt, M. John and C. Wandrey, *J. Chromatogr.*, **213**, 151 (1981)). Условия: колонка 90 см × 7,8 мм, сорбент: катионообменник с иммобилизованными ионами кальция, подвижная фаза — вода, скорость подвижной фазы 1 мл/мин, температура колонки 85 °С, рефрактометрический детектор

Поэтому для анализа углеводов необходим катионообменник с иммобилизованными на нем ионами кальция (рис. 12.5)¹.

Ионная эксклюзия — еще один механизм разделения, который может иметь место при работе с ионообменниками². Ионные функциональные группы на поверхности ионообменника благодаря действию электростатической силы отталкивают одноименно заряженные ионы анализата, предотвращая таким образом их проникновение в поры сорбента. Такое разделение основано на принципах эксклюзионной хроматографии, которые более подробно описаны в главе 15. (Обратите внимание на то, что причины эксклюзии в двух случаях разные.) В условиях ион-эксклюзионной хроматографии ионы элюируются в пределах мертвого объема колонки. На рис. 12.6 показан пример разделения ионов по механизму ионной эксклюзии, который может быть высокоэффективным, если выполняется следующее условие:



Ионная хроматография — особый вид ионообменной хроматографии, который подробно описан в главе 14.

¹ Более подробно см. Ion-moderated Partition Chromatography в книге L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.J. Kirkland. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed., 2010. — *Прим. пер.*

² J.S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **546**, 111 (1991).

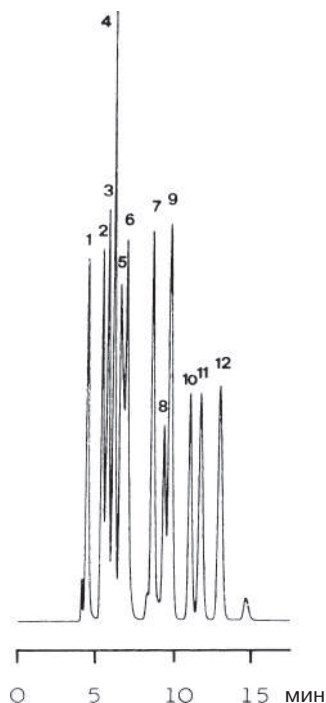


Рис. 12.6. Разделение карбоновых кислот с помощью ион-эксклюзионной хроматографии на катионообменнике (печатается с разрешения из E. Rajakylä, *J. Chromatogr.*, **218**, 695 (1981)). Условия: колонка 300×7,8 мм, сорбент Aminex HPLX-87, 9 мкм, подвижная фаза 0,006N H₂SO₄, скорость подвижной фазы 0,8 мл/мин, температура 65°C, УФ, 210 нм. Пики: 1 — щавелевая кислота, 2 — малеиновая кислота, 3 — лимонная кислота, 4 — винная кислота, 5 — глюконовая кислота, 6 — яблочная кислота, 7 — янтарная кислота, 8 — молочная кислота, 9 — глутаровая кислота, 10 — уксусная кислота, 11 — левулиновая кислота, 12 — пропионовая кислота

12.6. Практическое применение

Количество образца нужно выбирать таким образом, чтобы не превышать 5 % от максимальной ионообменной емкости сорбента (без ухудшения качества разделения).

Задача 29

Емкость катионообменника LiChrosorb CXS составляет 850 мкэкв/г. В колонке 15 г геля. Какое максимальное количество ²⁴NaCl можно загрузить на эту колонку без ухудшения качества разделения?

Решение

Общая ионообменная емкость колонки = $0,85 \text{ мкэкв/г} \times 15 \text{ г} = 12,75 \text{ мкэкв}$.

5 % от общей емкости составляет $0,64 \text{ мкэкв}$.

Молярная масса $^{24}\text{NaCl} = 59,5 \text{ г/моль}$.

$0,64 \text{ мкмоль}$ от $^{24}\text{NaCl} = 38 \text{ мг}$.

Когда нужно разработать методику разделения, то лучше всего начинать с 50 мМ буфера. Концентрация буфера не должен быть менее 20 мМ , иначе сложно гарантировать эффективность буферных свойств раствора. Соль, используемая для приготовления буфера, должна быть высокой чистоты.

pH подвижной фазы зависит от кислотно-основных свойств образца, т.е. от его pK_a^1 . В катионообменной хроматографии pH элюента должно быть не более чем на 1,5 единицы больше pK_a анализируемого основания. Это значит, что не более 10 % образца находится в диссоциированной форме, поэтому даже незначительное изменение pH влечет существенное изменение во времени удерживания. Для разделения кислых компонентов образца с помощью анионообменной хроматографии значения pH должны быть, наоборот, меньше pK_a . Оптимальное значение pH или градиент лучше подбирать опытным путем. Некоторые стандартные значения pH приведены в табл. 12.2.

Таблица 12.2. Значения pK_a и pH элюента для разных типов образцов

Образец	pK_a	Приблизительное значение pH элюента
Алифатические амины	Преимущественно 9,5–11	11–12,5
Ароматические амины	4,5–7	6–8,5
Карбоновые кислоты	~5	3,5
Фенолы	~10	8,5

Необходимо отметить, что буферные свойства раствора будут эффективными только тогда, когда значение pH отличается от pK_a буферной соли не более чем на ± 1 . Например, фосфат имеет три значения pK_a : 2,1, 7,2 и 12,3. Значит, из него можно приготовить буферы с pH 1,1–3,1 и 6,2–8,2 (значение pH 12,3 слишком велико). Значения pK_a цитрата составляют 3,1, 4,7 и 5,4, ацетата — 4,8 (см. раздел 5.4).

Добавки в подвижную фазу: обычно размывание заднего фронта пика можно уменьшить, добавив смешивающийся с водой органический растворитель². Как правило, чтобы предотвратить рост грибков на ионообменниках на основе полистирола или любых другие органических полимеров, в элюент добавля-

¹ Величина pK_a кислоты HA: HA диссоциирует на H^+ и A^- . Константа равновесия $K_a = [\text{H}^+][\text{A}^-]/[\text{HA}]$. pK_a — отрицательный логарифм K_a . Если pH раствора равно pK_a , то кислота HA диссоциирована на 50 %.

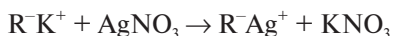
² Необходимо понимать, что при этом может существенно измениться селективность разделения. — *Прим. пер.*



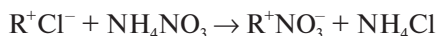
ют небольшое количество фунгицида, например капроновой кислоты, солей фенилртути (II), азиды натрия, трихлорбутанола, тетрахлорметана или фенола.

В ионообменной хроматографии для снижения вязкости элюента, увеличения числа теоретических тарелок и уменьшения времени удерживания обычно увеличивают температуру, при которой проводят разделение, до 60–80 °С.

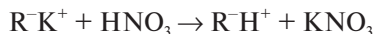
Промывка колонки новым элюентом, содержащим другой противоион, позволяет легко изменить ионную форму ионообменника, особенно если новый противоион обладает большей элюотропной силой. Например:



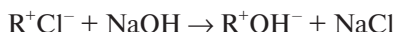
и



Если новый противоион обладает меньшей элюотропной силой, то необходимо перевести ионообменник сначала в H^+ - или OH^- -форму. Для этого колонку промывают избытком раствора кислоты или основания, а затем водой до нейтрализации элюата:



и



Затем через колонку медленно прокачивают раствор с новым противоионом, при этом значение pH элюента должен быть как можно больше в случае катионообменника и как можно меньше в случае анионообменника. Образующаяся вода смещает равновесие в требуемом направлении:



и



Внимание: следует избегать выпадения в осадок нерастворимых солей внутри колонки.

12.7. Практические приложения

Все лантаноиды можно разделить на катионообменнике в условиях, представленных на рис. 12.7, за 30 мин. Лантаноиды элюируются из колонки строго в порядке уменьшения атомных масс. Прометий в природе практически не встречается, поэтому он отсутствует, но должен находиться в промежутке между самарием и неодимом.

На рис. 12.8 приведен пример высокоэффективной ионообменной хроматографии. На хроматограмме показано быстрое разделение 22 нуклеотидов и родственных им соединений.

На рис. 12.9 изображено разделение РНК, ДНК и плазмиды из клеточного лизата на широкопористой (400 нм) аминофазе.

Дополнительные примеры также приведены на рис. 18.1, 18.3 и 18.17.

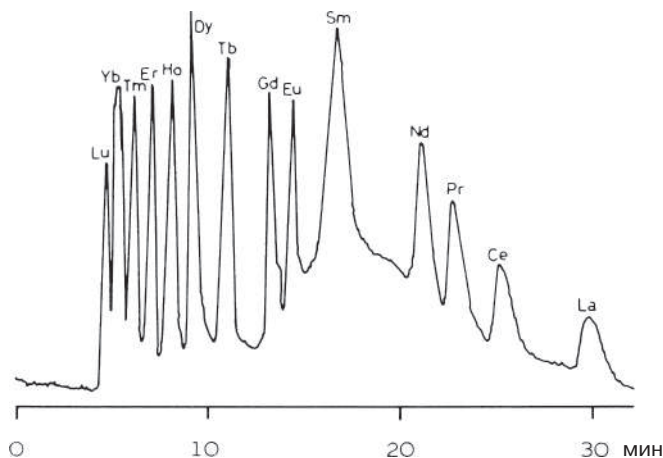


Рис. 12.7. Разделение лантаноидов на катионообменнике (печатается с разрешения из A. Mazzucotelli, A. Dadone, R. Frache and F. Baffi, *Chromatographia*, **15**, 697 (1982)). Условия: колонка 250×4 мм, сорбент Partisil SCX, 10 мкм, подвижная фаза 2-гидроксиизомасляная кислота в воде, скорость потока 1,2 мл/мин, градиент 0,03–0,07 М, детектирование в видимой области, 520 нм, дериватизация 4-(пиридилазо)-резорцинолом

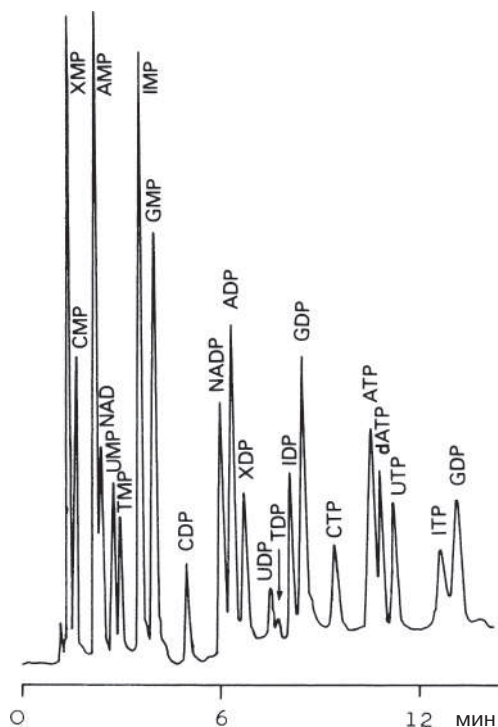


Рис. 12.8. Разделение нуклеотидов и родственных соединений на анионообменнике (печатается с разрешения D. Perrett, *Chromatographia*, **16**, 211 (1982)). Условия: сорбент APS-Hypersil, 5 мкм, подвижная фаза А = 0,04 М KH_2PO_4 (рН 2,9), В = 0,5 М KH_2PO_4 + 0,8М KCl (рН 2,9), линейный градиент от А до В за 13 мин, УФ, 254 нм

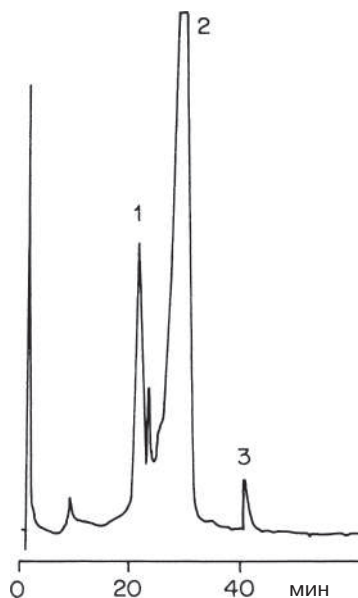


Рис. 12.9. Разделение клеточного лизата *E. Coli*, содержащего плазмиду pBR 322 [печатается с разрешения М. Colpan and D. Riesner, *J. Chromatogr.*, 296, 399 (1984)]. Условия: колонка 75×6,2 мм, сорбент Nucleogen Dimethylamino 4000, 10 мкм, подвижная фаза 20 мМ фосфат калия (рН 6,9), скорость потока 2 мл/мин, градиент от 0 до 1,5 М хлорида калия за 50 мин, УФ, 260 нм. Пики: 1 — клеточная РНК, 2 — клеточная ДНК, 3 — плазмида

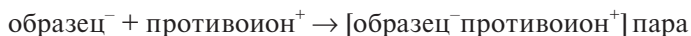
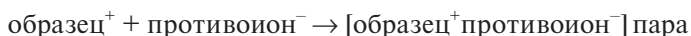
ГЛАВА 13

ИОН-ПАРНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

13.1. Введение

Ион-парная хроматография представляет собой альтернативу ионообменной хроматографии. Хотя с помощью ионообменной хроматографии можно решить множество задач, но разделение образца, который одновременно содержит кислоты, основания и нейтральные соединения, будет весьма затруднительно. Для этого хорошо подходит ион-парная хроматография. В качестве сорбентов для ион-парной хроматографии используют обращенные фазы, описанные в главе 10, что делает ее еще более популярной.

Ионные образцы можно разделить с помощью обращенно-фазовой хроматографии, при условии, что они содержат либо только слабые кислоты, либо только слабые основания (кроме нейтральных соединений), находящиеся в неионизированной форме. Для такого разделения нужно подобрать буферный раствор с подходящим рН. Этот метод известен как «подавление ионов»¹, он же используется и в ион-парной хроматографии. Органические ионные вещества, добавленные в подвижную фазу, образуют с молекулами образца противоположного заряда ионную пару. Фактически образуется соль, но ее хроматографическое поведение напоминает неионную органическую молекулу:



Поэтому можно воспользоваться обращенно-фазовой хроматографией, добавив, например, к катионному образцу алкилсульфонат, а к анионному — фосфат тетрабутиламмония. Образец, содержащий как анионные, так и катионные соединения, с одной стороны «маскируется» противоионами, а с другой стороны ионизация подавляется буфером с соответствующим значением рН.

Подытожим некоторые преимущества использования ион-парной хроматографии для разделения ионов:

- а) можно использовать те же сорбенты и элюенты, что и в ОФХ;

¹ Этот метод неприменим к сильным кислотам и основаниям, поскольку они диссоциируют в широком интервале рН и для подавления ионов потребуются предельные значения рН. Специально для этих случаев была разработана ионная хроматография (раздел 14).



- б) можно разделять смесь, содержащую кислоты, основания, нейтральные вещества и амфотерные соединения (у которых есть одновременно катионная и анионная группы);
- в) ион-парная хроматография может быть хорошим выбором, когда значения pK_a веществ близки;
- г) выбор ИПА (ион-парного агента) влияет на селективность.

13.2. Практическая ион-парная хроматография

С помощью ион-парной хроматографии можно разделять все ионные соединения, но не все ИПА одинаково хорошо для этого подходят¹. В табл. 13.1 перечислены некоторые ИПА, пригодные для ОФХ с подвижной фазой метанол — вода или ацетонитрил — вода².

Существует целый ряд готовых смесей ИПА в буферных растворах, однако некоторые хроматографисты предпочитают придумывать собственные «коктейли» для решения своих задач. Вот некоторые примеры (Waters):

- а) тетрабутиламмоний фосфат, ${}^+N(C_4H_9)_4$, при pH буфера 7,5, образует ионные пары с сильными и слабыми кислотами, при этом буфер подавляет ионизацию слабых оснований;
- б) алкилсульфоновые кислоты, $CH_3(CH_2)_nSO_3^-$, $n = 4-7$, при pH буфера 3,5, образуют ионные пары с сильными и слабыми основаниями, при этом буфер подавляет ионизацию слабых кислот. Чем длиннее алкильная часть, тем сильнее удерживание.

Амфотерные соединения (например, *n*-аминобензойная кислота, $H_2NC_6H_4COOH$, у которой NH_2 -группа выполняет функцию основания, а $COOH$ — кислоты) можно элюировать любым из предложенных выше ИПА. С первым ИПА карбонильная группа образует ионную пару, а диссоциация аминогруппы подавляется буфером. Со вторым ИПА все наоборот.

Проблемы возникают только с растворами, которые одновременно содержат сильные и слабые кислоты и основания. Либо сильные основания, либо сильные кислоты будут находиться в ионной форме. Впрочем, такие растворы встречаются редко.

Значения k пропорциональны концентрации ИПА, поэтому на времена удерживания влияет не только тип противоиона, но и его концентрация. В некоторых случаях с целью оптимизации разделения можно использовать два ИПА вместо одного, например смесь пентан- и октансульфокислоты. Естественно, на времена удерживания, кроме всего прочего, может влиять и доля органического растворителя в подвижной фазе, поэтому для оптимизации разделения можно провести все этапы, описанные в главе 10, включая добавление конкурирующих соединений.

¹ B. A. Bidlingmeyer, *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 525 (1980); J. W. Dolan, *LC GC Eur.*, **21**, 258 (2008) или *LC GC North Am.*, **26**, 170 (2008).

² R. Gloor and E. L. Johnson, *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 413 (1977).

Таблица 13.1. Применения некоторых противоионов в качестве ИПА

Противоион	Область применения
Четвертичные амины, например тетраметил-, тетрабутил-, пальмитилтриметиламмоний	Анализ сильных и слабых кислот, сульфонированных красителей, карбоновых кислот
Третичные амины, например триоктиламин	Анализ сульфонатов
Алкил- и арилсульфонаты, например метан- и гептансульфонат, камфорсульфоокислота	Анализ сильных и слабых оснований, солей бензалкония, катехоламинов
Перхлорная кислота	Образует сильные ионные пары со многими основаниями
Алкилсульфаты, например лаурилсульфат	Такая же, как и для сульфокислот, но с другой селективностью

Четвертичные аммониевые соли в щелочной среде растворяют силикагель. В таких случаях настоятельно рекомендуется еще до инжектора установить преднасыщающую колонку, в которой подвижная фаза насыщается силикагелем.

Глур и Джонсон дают некоторые практические советы по ион-парной хроматографии:

- к ней следует прибегать в тех случаях, когда обращенно-фазовая хроматография и хроматография при подавлении ионизации не помогли или когда образец содержит одновременно неионные и ионные соединения;
- в качестве подвижной фазы рекомендуется смесь метанол-вода, которая минимизирует проблемы, связанные с растворимостью ИПА. Если селективность разделения неудовлетворительная, то в качестве альтернативы используют смесь ацетонитрил-вода, правда, в этом случае возможны проблемы с растворимостью ИПА;
- очень важен правильный выбор ИПА. Если молекулы в анализируемой смеси мало отличаются по своей структуре, то выбирают ИПА с короткими алкильными заместителями. Если требуется увеличить времена удерживания соединений, то лучше использовать более гидрофобные длинноцепочечные ИПА;
- необходимо удостовериться в растворимости ИПА в подвижной фазе (особенно если используют градиент!);
- следует выбирать такое значение pH подвижной фазы, при котором анализируемое соединение будет максимально ионизировано. При этом необходимо учитывать стабильность сорбента (при выбранном pH), в качестве которого используют силикагель с привитыми алкильными группами (стабилен в интервале pH 2,0–7,4);
- для начальных экспериментов рекомендуют выбирать обращенную фазу на основе силикагеля с C18 или C8 мономерным покрытием. Силикагель с более короткими алкильными цепями менее стабилен;



- ж) подвижную фазу следует дегазировать перед добавлением ИПА во избежание вспенивания (особенно это касается использования длинноцепочечных детергентоподобных соединений);
- з) концентрация¹ ИПА должна находиться в интервале 1–10 мМ (желательно длинноцепочечный ИПА брать с низкой концентрацией, а короткоцепочечный — с высокой). Буфер необходимый для поддержания требуемого уровня рН, добавляют ко всем участвующим в градиенте растворам подвижной фазы в равных количествах;
- и) оптимизация градиента, смена ИПА или изменение концентрации буфера и т. д. Если в состав образца входят ионные и неионные соединения, то сначала рекомендуется оптимизировать элюцию неионных соединений. После этого подбирать ИПА, с помощью которого будут элюироваться ионные соединения с подходящими временами удерживания;
- к) до тех пор, пока капилляры и колонка заполнены элюентом, содержащим ИПА, насос должен постоянно работать. В ночное время во избежание выпадения осадка расход можно снизить до 3–5 мл/ч;
- л) необходимо убедиться в прозрачности ИПА в УФ-области.

Пять дополнительных рекомендаций:

- м) возможно, крупные молекулы будут лучше разделяться, если перед нанесением на колонку добавить стехиометрическое количество ИПА к образцу для образования ионных пар. При этом необходимо поддерживать такое значение рН раствора, при котором наблюдается максимальная ионизация анализируемого образца;
- н) общее правило: ИПА склонны оказывать негативное воздействие на силикагель;
- о) колонки с ИПА следует использовать только для ион-парной хроматографии;
- п) в ион-парной хроматографии равновесие наступает медленно. Поэтому при изменении состава подвижной фазы для уравнивания колонки через нее следует прокачать как минимум 20 колоночных объемов;
- р) в ион-парной хроматографии следует контролировать температуру, поскольку от нее зависит равновесие системы.

13.3. Другие области применения

На рис. 13.1 и 13.2 приведены примеры разделения катионов и анионов с использованием ИПА. Еще один пример ион-парной хроматографии изображен на рис. 22.2.

¹ L. R. Snyder, J. J. Kirkland and J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, Wiley-Interscience, New York, 2nd ed., 1997, Раздел 7.4, pp. 317–341.

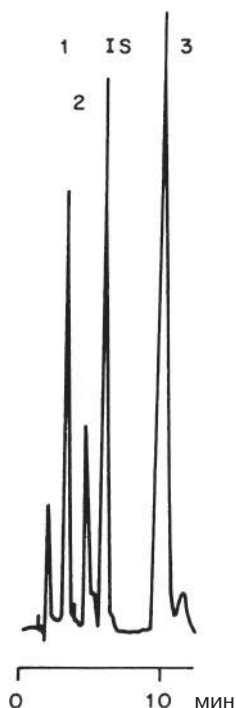


Рис. 13.1. Анализ катехоламинов в моче (печатается с разрешения из Bioanalytical Systems). Условия: сорбент — октилсилан, подвижная фаза — цитрат-фосфатный буфер (pH 4), содержащий 7% метанола и 80 мг/л октилсульфата натрия, электрохимический детектор, +700 мВ. Приготовление образца описано в работе R. M. Riggin *et al.*, *Anal. Chem.*, **49**, 2109 (1977). Пики (с концентрациями в моче): 1 — норэпинефрин (160 нг/мл), 2 — эпинефрин (31 нг/мл), 3 — допамин (202 нг/мл), IS — 3,4-дигидроксибензиламин (внутренний стандарт)

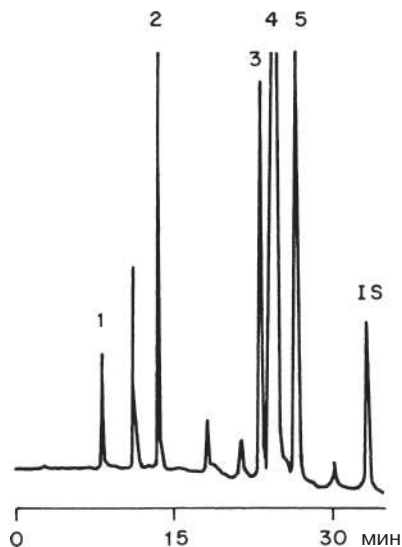


Рис. 13.2. Анализ α -кетокислот в плазме (T. Hayashi, H. Tsuchiya and H. Naruse, *J. Chromatogr.*, **273**, 245 (1983). Условия: образец — экстракт из 50 мкл плазмы крови человека, дериватизация о-фенилендиамин, колонка 250×4 мм, сорбент — LiChrosorb RP-8, 5 мкм, подвижная фаза 1 мМ тетрапропиламмония бромид в 50 мМ фосфатном буфере — ацетонитрил, скорость подвижной фазы 1 мл/мин, градиент 5–60% ацетонитрила, температура 50°C, флуоресцентный детектор, 350/410 нм. Пики: 1 — α -кетоглутаровая кислота, 2 — пировиноградная кислота (α -кетопропионовая кислота), 3 — α -кетоизовалериановая кислота, 4 — α -кетоизокапроновая кислота, 5 — α -кето- β -метилвалериановая кислота, IS — α -кетокaproливая кислота (внутренний стандарт)

13.4. Приложение: УФ-детектирование при помощи ИПА¹

ИПА, поглощающие в УФ-диапазоне, облегчают детектирование анализируемых соединений, которые не поглощают в УФ-области. Равновесное распределение ионов между подвижной и неподвижной фазами, поглощающих в УФ-области, специфически нарушается, когда в колонку вводят образец. Будучи УФ-невидимыми сами по себе, компоненты образца регистрируются

¹ M. Denkert, L. Hackzell, G. Schill and E. Sjögren, *J. Chromatogr.*, **218**, 31 (1981); L. Hackzell and G. Schill, *Chromatographia*, **15**, 437 (1982).

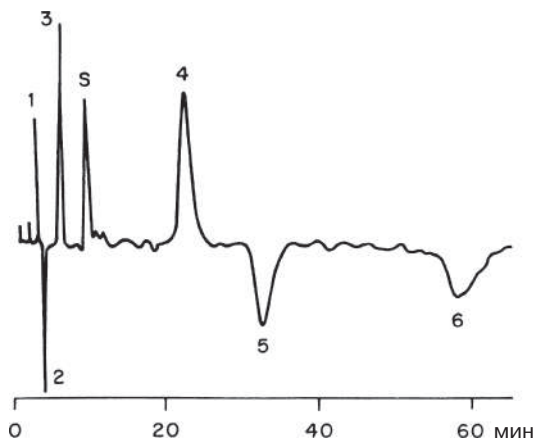


Рис. 13.3. Разделение анионных и катионных соединений, не поглощающих в УФ-области (печатается с разрешения Elsevier Science Publishers BV из M. Denkert et al., *J. Chromatogr.*, 218, 31 (1981)). Анионы, детектируемые до системного пика, на хроматограмме выглядят, как положительные пики, катионы — как отрицательные пики, а после системного пика наоборот. Условия: колонка $100 \times 3,2$ мм, сорбент — Bondapak Phenyl, 10 мкм, подвижная фаза 4×10^{-4} М нафталин-2-сульфонат в 0,05 М фосфорной кислоте, скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин, УФ, 254 нм. Пики: 1 — бутилсульфат, 2 — пентиламин, 3 — гексансульфонат, 4 — гептиламин, 5 — октансульфонат, 6 — октилсульфат, S — системный пик

УФ-детектором. Следовательно, этот метод можно рассматривать в качестве альтернативы рефрактометрическому детектированию и как способ непрямого детектирования, который уже упоминался в разделе 6.9.

В зависимости от заряда и значений k компонентов образца на хроматограмме могут присутствовать пики как в положительной, так и в отрицательной области. Кроме того, можно наблюдать один и более «системный пик», т. е. пики, которые не являются компонентами пробы (рис. 13.3). Это явление доказано и подробно описано в работах¹.

Далее приведены некоторые рекомендации для приготовления подвижной фазы, позволяющие получить хорошие результаты¹:

- а) чувствительность будет оптимальна тогда, когда значения k интересующего вещества и системного пика ИПА будут примерно одинаковы. По той же причине молярный коэффициент поглощения ИПА должен быть большой;
- б) важно использовать как можно более простую подвижную фазу, чтобы избежать проблем с чувствительностью и формой пика. Желательно, чтобы она состояла только из ИПА и гидрофильного буфера;
- в) рекомендуется использовать апротонный ИПА, т. е. тот, который не образует водородных связей;
- г) емкость буфера и его концентрация не должны быть низкими, чтобы коэффициент распределения ИПА оставался примерно постоянным.

¹ E. Arvidsson, J. Crommen, G. Schill and D. Westerlund, *J. Chromatogr.*, **461**, 429 (1989).

ГЛАВА 14

ИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ¹

14.1. Основы

Ионная хроматография — особый метод, разработанный для разделения неорганических ионов и органических кислот. Обычно детектирование осуществляют мониторингом проводимости² элюата, несмотря на то, что некоторые ионы способны поглощать в УФ-области или их возможно детектировать в видимой области после дериватизации. С помощью ионной хроматографии можно определять:

- а) ионы в питьевой и водопроводной воде (самым важным является определение хлоридов, нитратов, сульфатов и гидрокарбонатов);
- б) нитраты в овощах;
- в) фториды в зубной пасте;
- г) бромиды, сульфаты и тиосульфаты в фиксирующих растворах;
- д) органические кислоты в напитках;
- е) ионы аммония, калия, нитраты и фосфаты в почве и удобрениях;
- ж) ионы калия и натрия в клинических анализах физиологических жидкостей и инфузионных растворов.

В ионной хроматографии сорбенты, в отличие от сорбентов в классической ионообменной хроматографии, описанной в главе 12, имеют низкую обменную емкость. Поэтому ионная сила элюента может быть достаточно низкой, и самыми распространенными являются 1 мМ растворы. Такие разбавленные элюенты обладают низкой проводимостью, что облегчает детектирование. Тем не менее даже при низкой концентрации электролита в подвижной фазе фоновая проводимость остается высокой при кондуктометрическом детектировании. Существует два способа подавления фоновой проводимости: электронный и химический.

14.2. Способы подавления

Электронный способ подавления возможен в том случае, когда элюент состоит из буфера со сверхнизкой проводимостью, например из фталатного. У детектора

¹ J.S. Fritz and D.T. Gjerde, *Ion Chromatography*, Wiley — VCH, Weinheim, 4th ed., 2009; C. Eith, M. Kolb, A. Seubert and K.H. Viehweger, *Practical Ion Chromatography — An Introduction*, Metrohm, Herisau, 2001.

² R.D. Rocklin, *J. Chromatogr.*, **546**, 175 (1991); W.W. Buchberger, *Trends Anal. Chem.*, **20**, 296 (2001).



при этом должна быть функция компенсации фоновой проводимости. Такие условия позволяют проводить линейную калибровку в широком диапазоне, но детектировать малые количества, используя электронный способ подавления, достаточно сложно. По традиции этот метод называют *одноколоночной ионной хроматографией*.

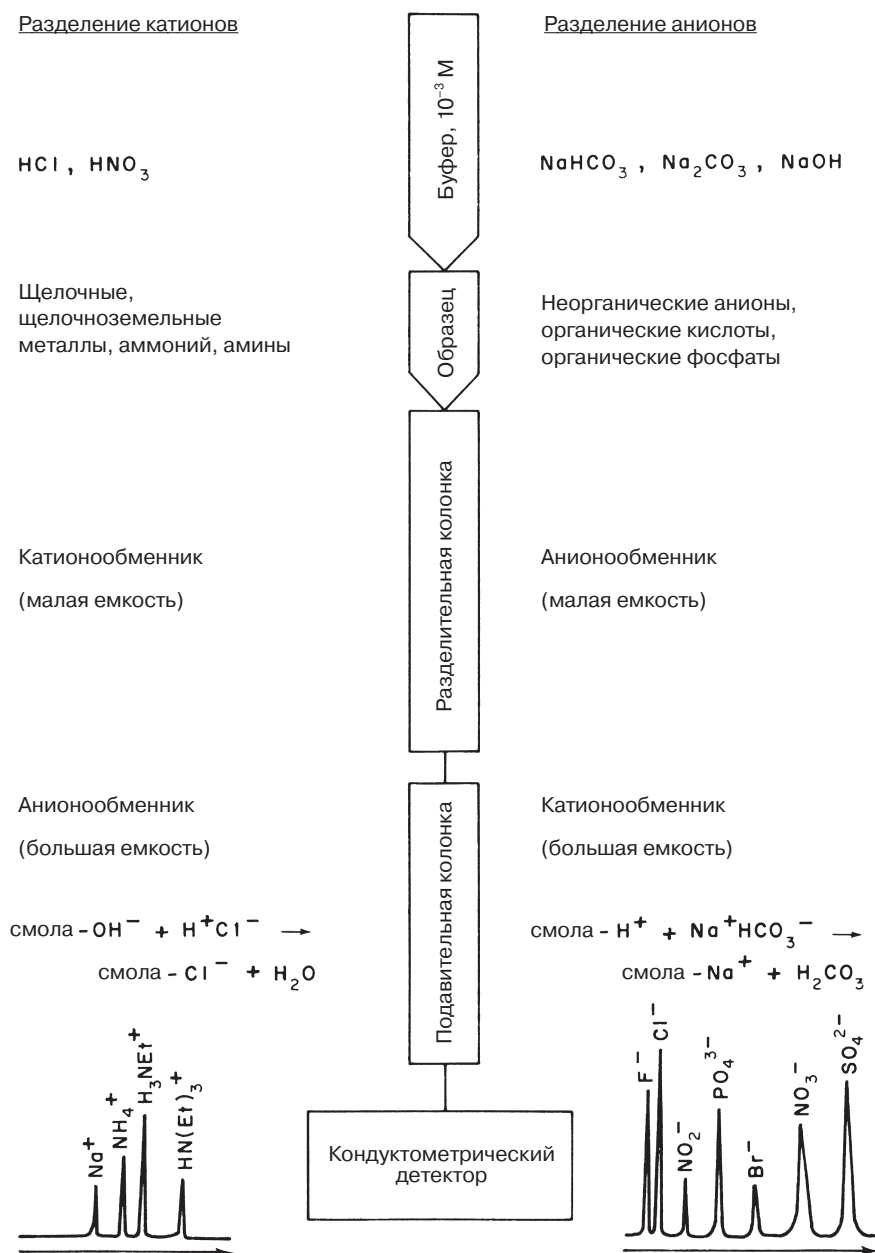


Рис. 14.1. Ионная хроматография с подавительной колонкой

Химический способ использует подавление ионов буфера при прохождении элюата от колонки до детектора. Элюат проходит через небольшую колонку, упакованную ионообменной смолой, или ионопроницаемую мембрану, или полое волокно. Протоны H^+ замещают катионы буфера (при анализе анионов), а гидроксил-ионы OH^- замещают анионы буфера (при анализе катионов). При этом образуется вода, проводимость которой очень низка. На рис. 14.1 наглядно изображено, какие реакции протекают в подавительной колонке при разделении катионов (левая часть рисунка, в качестве подвижной фазы используют разбавленные кислоты) и анионов (правая часть рисунка, элюент — разбавленные основания). Подавительную колонку можно регенерировать соответствующим буферным раствором или электрохимически полученными ионами OH^- или H^+ . Если конструкция хроматографической системы позволяет использовать две установленные параллельно подавительные колонки, то одна из них служит для подавления элюента, в то время как другая находится на регенерации. В следующем анализе первую колонку регенерируют, а вторую используют для подавления. Если в качестве подавителя используют мембрану или волокно, то их внешняя поверхность требует продолжительной промывки основным (в случае анализа катионов) или кислым (в случае анализа анионов) раствором. Таким образом, на внешней поверхности мембраны проникающие туда ионы буфера замещаются молекулами воды. Химический способ подавления также называют *двухколоночной ионной хроматографией*. При его использовании линейный калибровочный диапазон ограничен, но возможно детектировать намного более низкие концентрации ионов по сравнению с электронным способом подавления.

Проводимость сильно зависит от температуры, поэтому необходимо тщательно термостатировать детектор.

14.3. Элюенты¹

Подвижная фаза и сорбент должны соответствовать друг другу. Тот или иной элюент не всегда может должным образом взаимодействовать с выбранным ионообменником. Обычно в качестве элюента для разделения анионов с электронным подавлением используют растворы фталевой или бензойной кислоты, иногда с малым содержанием ацетона или метанола (чтобы изменить селективность). При анализе катионов — азотную, щавелевую, винную, лимонную или дипиколиновую кислоту (последняя служит для комплекссообразования). Химическое подавление с такими элюентами, как карбонат/гидрокарбонат, гидроксид натрия или гидроксид калия, используется почти исключительно в анионном анализе. Подвижные фазы с гидроксидом калия могут быть электрохимически синтезированы из воды и коммерчески доступных картриджей с калиевым электролитом. Таким образом, можно избавиться от необходимости готовить на рабочем месте элюент и отслеживать его качество.

¹ C. Sarzanini, *J. Chromatogr. A*, **956**, 3 (2002).

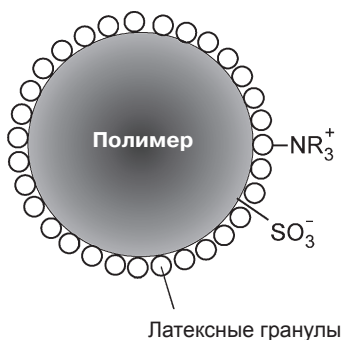


Рис. 14.2. Анионообменник с агрегированными латексными гранулами

Подвижная фаза должна быть очень чистой относительно определяемого иона или ионов образца. Предел обнаружения конкретного иона зависит от его концентрации в элюенте. Чем больше его концентрация в подвижной фазе, тем выше предел обнаружения (т. е. менее чувствительно его детектирование). В воде марки «для ВЭЖХ» могут быть ионы железа и другие ионы в достаточно высокой концентрации даже в том случае, когда ее проводимость равна 1 мкСм/см. Возможно, следует использовать воду, предназначенную для анализа следовых количеств неорганических молекул¹.

Если в состав подвижной фазы входит карбонат, то на хроматограмме всегда можно наблюдать системный пик (раздел 19.9), местоположение которого зависит от используемой колонки. Он может элюироваться близко или вместе с пиком хлорида (поэтому очень часто при анализе воды определяют сумму Cl^- и CO_3^{2-}), а может появиться и гораздо позже. Содержащийся в воздухе углекислый газ влияет на равновесие между ионами карбоната и гидрокарбоната, поэтому емкости, в которых находится подвижная фаза, должны быть снабжены CO_2 -поглотителями.

Для сорбентов, предназначенных для анионной хроматографии, используют как основу стиролдивинилбензол, полиметакрилат (который имеет ограниченную стабильность при повышенных давлениях) или поливиниловый спирт. В большинстве случаев в качестве ионообменной группы выступают производные триметиламина или диметилэтанолamina. Катионообменники получают на основе силикагеля, полиэтилен- или полибутадиенmaleиновой кислоты. Ионообменная группа может быть введена химической модификацией. Между тем функциональность многих сорбентов зависит от небольших (диаметром примерно 0,1 мкм) латексных гранул с четвертичными аминогруппами, удерживаемыми на сульфированном сорбенте благодаря электростатическим или Ван-дер-Ваальсовым связям (рис. 14.2). Такие сорбенты отличаются хорошими массообменными свойствами, поскольку имеют короткие диффузионные каналы, поэтому колонки на их основе имеют большое число теоретических тарелок. В то же время такие сорбенты химически менее стабильны по сравнению с фазами, полученными химической модификацией.

¹ I. Kano et al., *J. Chromatogr. A*, **1039**, 27 (2004).

14.4. Область применения

На рис. 14.3 показана хроматограмма анионного состава дождевой воды. На рис. 14.4 представлена хроматограмма разделения органических кислот и неорганических анионов в вине.

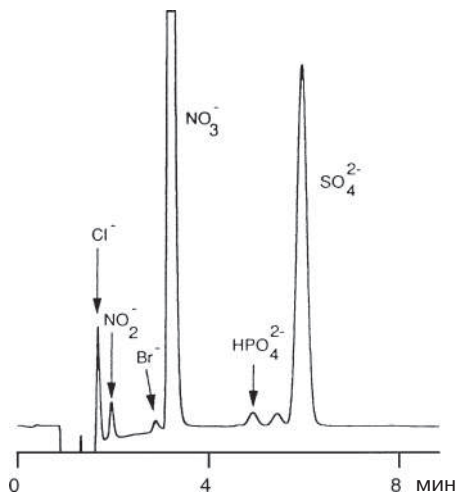


Рис. 14.3. Разделение неорганических анионов в дождевой воде [W. Shotyk, *J. Chromatogr.*, **640**, 309 (1993)]. Условия: сорбент AS4S, подвижная фаза 1,8 мМ Na_2CO_3 + 1,7 мМ NaHCO_3 , после подавляющей мембраны кондуктометрический детектор. Концентрации (в нг/г): хлорид 17, нитрит 51, бромид 5, нитрат 1329, гидрофосфат 50, сульфат 519

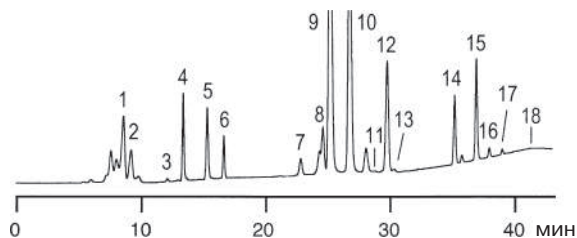


Рис. 14.4. Разделение органических кислот (как анионов) и неорганических анионов в вине (печатается с разрешения фирмы Dionex). Условия: колонка 250×4 мм с предколонкой, сорбент IonPac AS11-HC, скорость потока 1,5 мл/мин, нелинейный градиент от 1 до 60 мМ NaOH и от 0 до 20 % метанола, температура 30 °С, после подавительной колонки кондуктометрический детектор. Пики: 1 — лактат, 2 — ацетат, 3 — формиат, 4 — пируват, 5 — галактуронат, 6 — хлорид, 7 — нитрат, 8 — сукцинат, 9 — малат, 10 — тартрат, 11 — фумарат, 12 — сульфат, 13 — оксалат, 14 — фосфат, 15 — цитрат, 16 — изоцитрат, 17 — *цис*-аконитат, 18 — *транс*-аконитат

ГЛАВА 15

ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ¹

15.1. Принцип

Эксклюзионная хроматография принципиально отличается от всех других хроматографических методов тем, что она основана на простом разделении молекул анализируемого образца по размеру, а не на молекулярных взаимодействиях сорбента и образца.

Для упаковки колонны используют пористый материал. Единственно доступное пространство для тех молекул образца, которые слишком велики, чтобы диффундировать в поры сорбента, — это пространство между частицами стационарной фазы. Следовательно, они *исключаются*. Получается, что для них колонна заполнена непроницаемыми частицами стационарной фазы, и если не проявляются силы взаимодействия сорбент-аналит, то молекулы образца, увлекаемые током подвижной фазы, проходят через колонку за минимально возможное время.

Однако если в образце есть достаточно маленькие молекулы, способные проникнуть во все поры, то для них оказывается доступен весь объем подвижной фазы в колонне. Так как подвижная фаза застаивается в порах и молекулы могут перемещаться в порах только благодаря диффузии, то в конечном итоге они движутся медленнее, чем исключенные молекулы. Они последними добираются до детектора, т.е. время проскока, известное из других хроматографических методов, можно определять по ним. Во всех типах жидкостной хроматографии растворитель сам по себе не взаимодействует со стационарной фазой², а проходит через все поры, и его молекулы первыми появляются в ячейке детектора (если не наблюдается эксклюзия). В эксклюзионной хроматографии молекулы, сопоставимые по размерам с молекулами растворителя (такие же маленькие, как они), элюируются последними. Они полностью проникают в стационарную фазу (*которая для них полностью проницаема*). Это означает, что любой компонент образца вымывается из колонки не позднее времени проскока.

Молекулы средних размеров могут занимать только часть доступного объема пор. Маленькие свернутые молекулы со средним статистическим радиусом r_1 могут задерживаться в большем объеме пор, чем более крупные по размерам молекулы радиусом r_2 . Доступный объем пор на рис. 15.1 изображен часто

¹ A. M. Striegel, W. W. Yau, J. J. Kirkland and D. D. Bly, *Modern Size-Exclusion Chromatography*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2nd ed., 2009.

² Это идеальный случай. На самом деле не во всех. — *Прим. пер.*

заштрихованной областью. Для пор цилиндрической формы с радиусом $r_{\text{поры}}$ и протяженностью l соответствующее уравнение будет выглядеть так

$$\text{доступный объем поры} = (r_{\text{поры}} - r_{\text{молекулы}})^2 \cdot \pi \cdot (l - r_{\text{молекулы}})$$

Для наименьших молекул образца доступен наибольший объем пор, и, соответственно, проходя через колонку, они преодолевают наибольшую дистанцию. Эксклюзионная хроматография разделяет молекулы по размеру.

$r_{\text{молекулы}} > r_{\text{поры}}$	Объем поры недоступен	Первый пик
$r_{\text{молекулы}} < r_{\text{поры}}$	Доступный объем поры зависит от радиуса молекулы	Разделение в соответствии с размером молекул
$r_{\text{молекулы}} \ll r_{\text{поры}}$	Доступен весь объем пор	Последний пик

Подытожим:

- все молекулы образца элюируются (при условии отсутствия нежелательной адсорбции);
- время проскока есть показатель окончания процесса разделения (хроматограммы); следовательно, можно предсказать время разделения;
- объем или время элюции есть функция, зависящая исключительно от размера молекулы и, следовательно, косвенно от молекулярной массы. Эксклюзионная хроматография может быть использована для определения молекулярной массы;
- поскольку разделение завершается только после того, как небольшое количество подвижной фазы прокачено через колонку, пиковая емкость

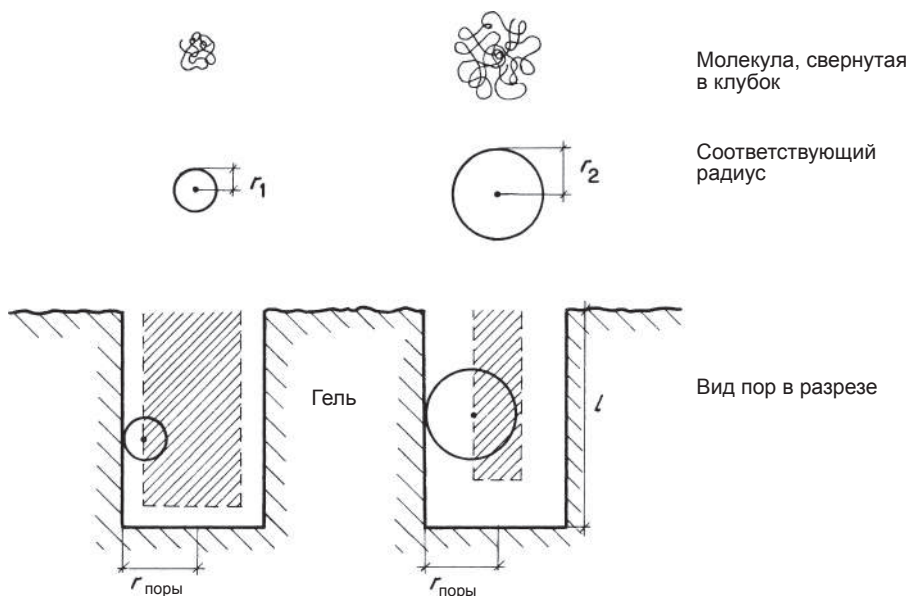


Рис. 15.1. Простая цилиндрическая модель пор в эксклюзионной хроматографии. В действительности не все поры одинаковы по размеру



колонки (т.е. количество пиков, которые могут быть отделены один от другого с соответствующим разрешением) ограничена.

Кроме того:

- д) два типа молекул могут быть разделены, при условии, что разница в их молекулярных массах составляет не менее 10 %¹;
- е) пики не уширяются при увеличении времени удерживания;
- ж) в противовес другим методам, молекулы будут задерживаться в «стагнирующей» подвижной фазе; следовательно, число теоретических тарелок в общем случае будет меньшим, чем это обычно бывает в ВЭЖХ;
- з) кривая Ван-Деемтера имеет необычный вид. Она не проходит через минимум и обрывается при низких скоростях потока. Малые скорости диффузии макромолекул означают, что величина B (см. раздел 8.6) ничтожно мала, и эффективность разделения увеличивается при увеличении продолжительности анализа²;
- и) в отсутствие взаимодействий со стационарной фазой нет ограничений, обусловленных количеством связывающих центров сорбента и установлением равновесия связывания; следовательно, можно разделять относительно большие количества³. Однако вязкость раствора образца не должна превышать больше чем вдвое вязкость подвижной фазы;
- к) так как объемы элюции малы, то уменьшение экстраколоночных объемов оборудования станет жизненно необходимым.

Задача 30

Какова последовательность выхода пиков при хроматографическом эксклюзионном разделении сахаров, показанных на рис. 12.5 (ионообменная хроматограмма)?

Решение

1. Крахмал	Большая молекулярная масса
2. Мальтогептаоза	1153
3. Мальтогексаоза	991
4. Мальтопентаоза	829
5. Мальтотетраоза	667
6. Мальтотриоза	504
7. Мальтоза	342

¹ Это довольно спорное утверждение. В большинстве случаев если мы хотим разделения до базовой линии, то эта разница должна быть куда как существеннее и находиться в интервале от 70 до 100 %. См.: *HPLC of Peptides and Proteins. Methods and Protocols*. Ed. By Marie-Isabel Aguilar 2004 Humana Press Inc. p. 65. — *Прим. пер.*

² Возможности быстрой эксклюзионной хроматографии: S. T. Popovici and P. J. Schoenmakers, *J. Chromatogr. A*, **1009**, 92 (2005).

³ Это представляется спорным утверждением. В эксклюзионной хроматографии мы строго ограничены и объемами нанесения, и количеством образца. — *Прим. пер.*

8. Маннитол, сорбитол	182
9. Глюкоза	180
10. Рамноза	164
11. Ксилоза, арабиноза	150
12. Эритритол	122

Крахмал — это макромолекула, которая выйдет в объеме исключения. За ним выходят олигосахариды в порядке уменьшения степени полимеризации. Мальтоза — это дисахарид; другие соединения являются моносахаридами или низкомолекулярными сахароспиртами (полиолами). Соединения под номерами 8 и 9 разделить невозможно, поскольку их молекулярные массы слишком близки. Порядок элюции частично отличается от разделения в ионообменной хроматографии, и некоторые соединения не смогут быть разделены из-за одинакового размера молекул.

15.2. Калибровочная хроматограмма

Колонка может быть откалибрована тестовой смесью соединений с точно определенными молекулярными массами, с тем чтобы найти объем элюции (V_E) для молекулы определенной молекулярной массы¹. Размеры тестовых молекул должны быть подобраны таким образом, чтобы знать наверняка, что:

- а) один компонент исключается;
- б) некоторые компоненты частично проникают в поры; и
- в) один компонент полностью проникает во все поры стационарной фазы.

В качестве примера может быть взята хроматограмма разделения олигомеров стирола с $n = 1-14$ (рис. 15.2). Крайний справа пик может быть идентифицирован как стирол. Это самая маленькая молекула (меньше только молекула подвижной фазы), и она элюируется последней. Свободный объем колонки V_0 соответствует объему элюции стирола. Первый маленький пик слева дают исключенные молекулы. Этому объему соответствует промежуточный объем V_1 (жидкость, находящаяся между отдельными частицами стационарной фазы)².

Молекулы со степенью полимеризации n от 14 до 1 элюируются между V_1 и V_0 . Объем $V_0 - V_1$ соответствует объему пор (V_p) стационарной фазы (жидкости в порах). V_p — единственный эффективный объем разделения и должен быть, таким образом, большим настолько, насколько это возможно. Пиковая емкость

¹ Монодисперсные образцы (один тип молекулы на отдельный пик) лучше всего подходят для калибровки, но полидисперсные тоже можно использовать для этих целей: M. Kubin, *J. Liq. Chromatogr.*, 7 Suppl., 41 (1984).

² Определяемый в этом случае объем V_0 соответствует объему проскока (мертвый объем), как это обсуждалось в разделе 2.3. Зачастую, однако, в литературе по гель-проникающей хроматографии объем, определенный здесь как V_1 , обозначается как V_0 потому, что это объем, после прохождения которого через колонку появляется первый пик.

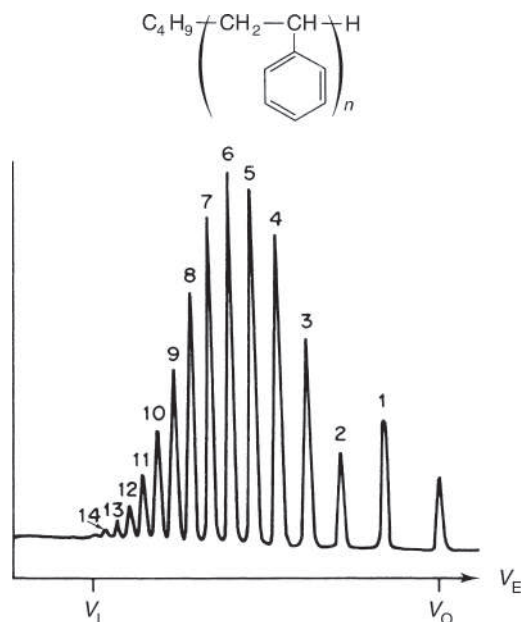


Рис. 15.2. Гель-проникающая хроматограмма олигомеров стирола с $n = 1-14$ [с разрешения W. Heitz, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **277**, 324 (1975)]. Условия: колонка, 1000×2 мм (свернутая кольцом); сорбент Merckogel 6000; элюент диметилформамид

зависит от V_p . Ясно, что эти пики следуют друг за другом тем ближе, чем меньше разница в их молекулярных массах.

В идеальном случае график зависимости логарифма молекулярной массы от объема элюции представляет собой прямую линию, характеризующую колонну (рис. 15.3). Однако встречаются и другие виды калибровочных графиков.

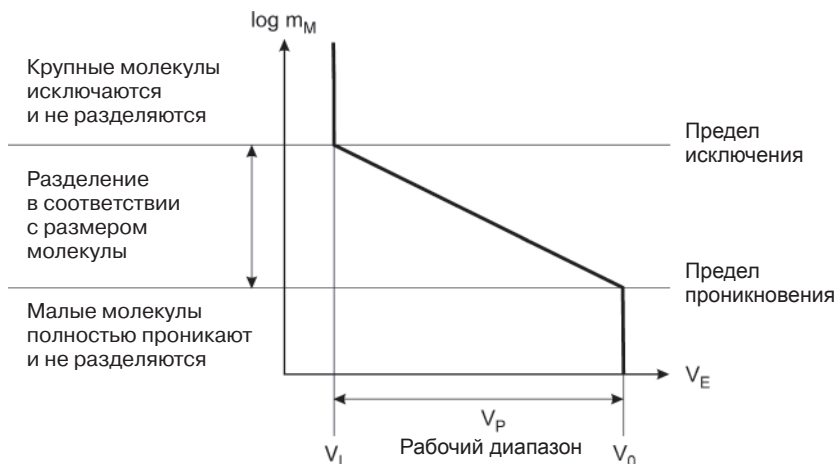


Рис. 15.3. Калибровочный график для эксклюзионной колонки

Задача 31

На рис. 15.14 представлено разделение белков молока. Нарисуйте калибровочную кривую, соответствующую этой хроматограмме.

Решение

На рис. 15.4 представлена теоретическая калибровочная кривая. Белая точка соответствует первому пику одного из белков с высоким молекулярным весом. Место этого пика по оси абсцисс можно определить, принимая во внимание объем, который может быть оценен по хроматограмме и равен 8,8 мл, но определить положение точки по оси ординат $\log m_M$ невозможно. Черные точки представляют слева направо: объем удерживания пика 2, равный 13,1 мл, масса 150 000 ($\log m_M = 5,18$); объем удерживания пика 3, равный 14,2 мл, масса 69 000 ($\log m_M = 4,84$); объем удерживания пика 4, равный 16,1 мл, и масса 35 000 ($\log m_M = 4,54$); объем удерживания пика 5, равный 17,9 мл, масса 16 500 ($\log m_M = 4,22$). Отметим, что получена калибровочная кривая (точки не ложатся на прямую).

Производители стационарных фаз или колонок для эксклюзионной хроматографии всегда снабжают каждый свой продукт информацией об интервале

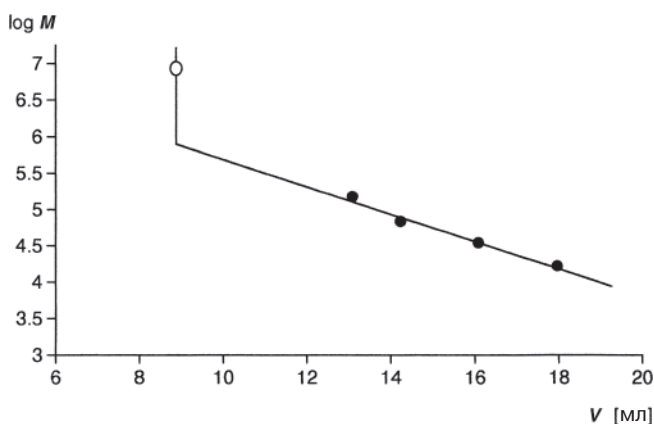


Рис. 15.4. Калибровочный график для белков молока из рис. 15.14

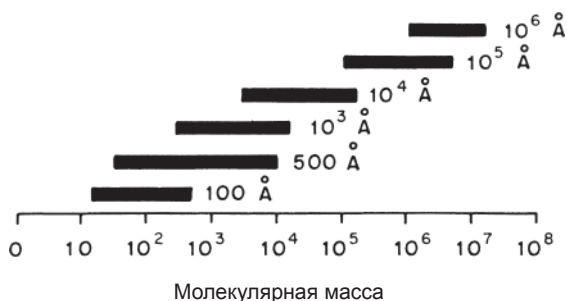


Рис. 15.5. Размер пор и диапазон разделения для типового набора коммерчески доступных колонок (приводится с разрешения Waters)



молекулярных масс, с которыми можно на этом сорбенте или колонке работать. В качестве примера, приведенного на рис. 15.5 для μ Styragel (Waters), изображена зависимость диапазона молекулярных масс от среднего размера пор ($10 \text{ \AA} = 1 \text{ нм}$).

Задача 32

Какая колонка лучше всего подойдет для разделения смеси, описанной в задаче 30?

Решение

Молекулярная масса изменяется в пределах от 122 до 1153. Колонка, упакованная сорбентом с размером пор 500 \AA , имеющая предел исключения около 10^4 , а для молекул, полностью проникающих во все поры, массу 50, может разделить сахара. Первый пик, крахмал, должен хорошо отделяться от других соединений.

15.3. Определение молекулярной массы с помощью эксклюзионной хроматографии¹

Сравнением хроматограммы образца (нижнее изображение на рис. 15.6) с калибровочным графиком (центральное изображение на рис. 15.6) может быть охарактеризована неизвестная фракция или распределение молекулярных масс полимера.

Объем элюции есть функция размера молекулы и, косвенно, ее массы. Это сравнение справедливо лишь для однотипных молекул (например, гомологов или, в данном случае, полистиролов) в одном и том же растворителе.

а) Различные типы молекул (например, полиамиды и полистиролы) могут иметь различный молекулярный вес, притом что объем элюции у них будет одинаков. Проще говоря, плотность анализируемых молекул может отличаться от плотности молекул стандарта. Полистироловые стандарты можно приспособить и для других веществ, но все же, если требуется определение молекулярных масс, гораздо лучше калибровать колонку соединениями, похожими по своей природе на соединения в образце.

б) Одна и та же молекула может иметь разный размер в различных растворителях (действительный или кажущийся) и, таким образом, может быть элюирована разными объемами. Свернутая молекула может как набухать, так и сжиматься (рис. 15.7). Молекула может быть сольватирована в каком-либо растворителе и, таким образом, увеличиваться в размере против обычного и оставаться прежних размеров в другом растворителе (рис. 15.8).

Даже концентрация раствора образца сильно влияет как на ширину пика, так и на время удерживания².

¹ Часть 8 в Striegel et al., см. начало этой главы.

² Anonymous, *J. Chromatogr. Sci.*, **30**, 66 (1992).

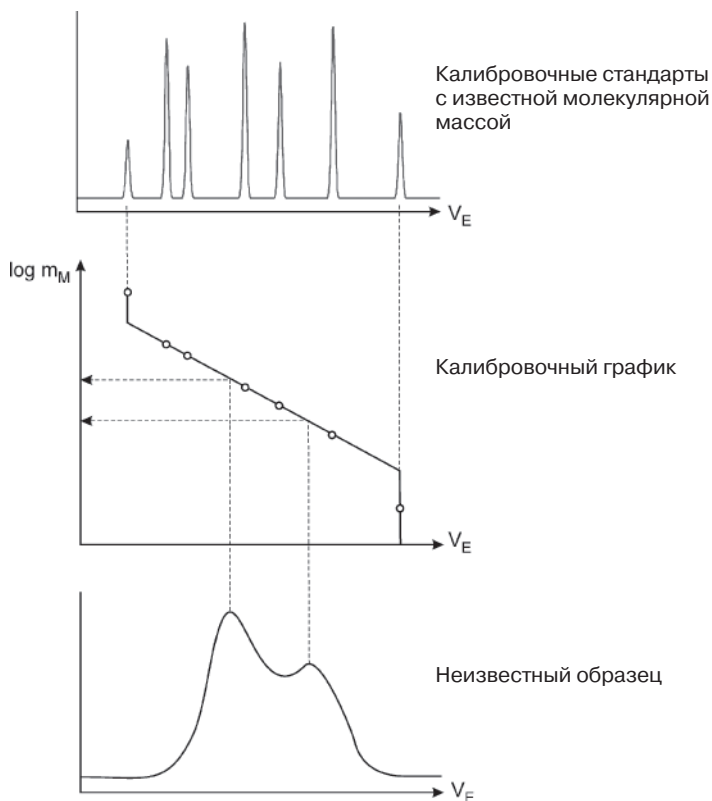


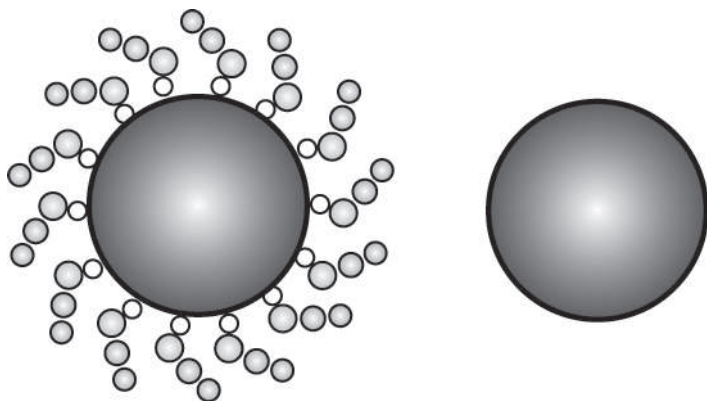
Рис. 15.6. Калибровочный график как вспомогательное средство при определении распределения молекулярных масс



Рис. 15.7. Свернутая молекула в более и менее набухом состоянии

Определение молекулярной массы и распределения молекулярных масс при помощи эксклюзионной хроматографии — дело простое и легкое¹. Однако оно основывается исключительно на объеме элюции, и он должен быть определен достаточно точно. Объем элюции есть функция логарифма молекулярной массы, и, следовательно, даже небольшие ошибки в определении V_E будут иметь драматические последствия. По этой причине необходимо термостатировать систему, при этом либо насос должен быть точен и давать воспроизводимый расход, либо нужно использовать параллельный способ постоянного измерения объема.

¹ Анализ данных, получаемых с помощью эксклюзионной хроматографии, см.: D. Held and P. Kilz, в *Quantification in LC and GC*, S. Fromidas and H. J. Kuss, eds, Wiley-VCH, Weinheim, 2009, раздел 13, с. 271—302.



Сольватированная (например, этанолом)

Несольватированная

Рис. 15.8. Различие в видимых размерах сольватированных и несольватированных молекул

Этот параллельный метод постоянного измерения объема прост и дешев. Элюат после прохождения через детектор направляется в сифон объемом 1 или 5 мл, верхушка которого при переполнении является триггером сигнала, отражаемого на хроматограмме. Объем элюции, таким образом, определяется по номеру сигнала. Время элюции может использоваться для прямого определения молекулярной массы, если насос достаточно хорош (и не из дешевых!). Термостатирование необходимо еще и потому, что различные компоненты хроматографической системы (подвижная фаза, сталь, стекло, фторопласт) имеют различные коэффициенты расширения. Элюент, голова насоса и колонка должны быть термостатированы в пределах $\pm 0,1^\circ\text{C}$, если объемы удерживания должны быть определены с точностью не менее 1 %.

Полностью проникающие в поры вещества могут быть использованы для определения количества теоретических тарелок. Производители рекомендуют метанол для $\mu\text{Styragel}$ с порами 100 \AA и *o*-дихлорбензол (не более 1 мкл) для колонок, упакованных сорбентами с порами $500\text{--}10^6\text{ \AA}$. Для 30-сантиметровых колонок количество теоретических тарелок, определяемых подобным способом, должно быть не меньше 3000—4000.

Тем не менее удельное разрешение $R_{\text{уд}}$ характеризует гель-фильтрационную колонку лучше:

$$R_{\text{уд}} = \frac{0,576}{b\sigma},$$

где b — константа, относящаяся к углу наклона калибровочной кривой; σ — стандартное отклонение пика гомогенного образца ($\sigma = w/4$). Точность определения молекулярных масс зависит от b и σ ¹.

¹ W. W. Yau, J. J. Kirkland, D. D. Bly and H. J. Stoklosa, *J. Chromatogr.*, **125**, 219 (1976).

15.4. Соединение нескольких колонок для эксклюзионной хроматографии

Существует два основных варианта.

а) Если разрешение компонентов образца неудовлетворительно, можно улучшить его, добавив одну или больше *колонок того же типа*, увеличив, таким образом, суммарный объем пор. Рисунок 15.9 показывает улучшение разрешения при использовании двух колонок вместо одной. Объем элюции, так же как и время анализа, удваиваются.

б) К примеру, колонка с порами 10^4 \AA разделяет молекулы с молекулярными массами в интервале 4000—200 000. Однако если требуется разделить образец, содержащий молекулы с большим диапазоном молекулярных масс, то для этого можно использовать набор из нескольких *различных типов колонок*, перекрывающих этот диапазон. Полный набор колонок, как это показано на рис. 15.5, может разделять образцы с интервалом молекулярных масс от 20 до $2 \cdot 10^6$, т.е. полный спектр. В качестве примера на рис. 15.10 изображено разделение стандартов полистирола с использованием четырех $\mu\text{Bondagel}$ -колонок (125, 300, 500, 1000 \AA).

В случае (б) удобно использовать набор из бимодальных колонок¹. Он содержит две или большее число колонок с двумя определенными размерами пор, которые различаются в 10 раз (например, 100 и 1000 \AA). Если объем пор обоих гелей/сорбентов одинаков, то получается оптимально линейный калибровочный график.

Заметим, что у компонента образца, неселективно проходящего через колонку (полностью исключенного или полностью проникающего в поры), неизбежно уширяется полоса и, следовательно, ухудшается разрешение. Подвижная

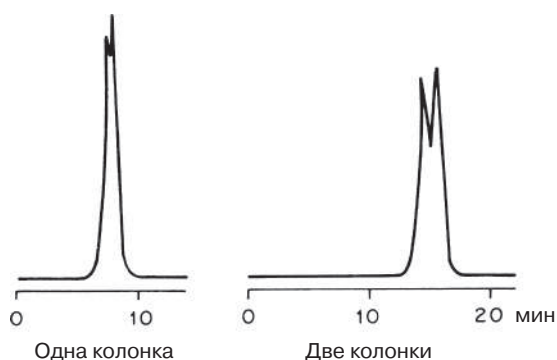


Рис. 15.9. Улучшение разрешения благодаря удвоенному объему пор. Условия: образец додекан и гексадекан; колонка(и) $300 \times 7,8 \text{ мм}$, сорбент $\mu\text{Styragel } 100 \text{ \AA}$, подвижная фаза — толуол, скорость потока 1 мл/мин, рефрактометрический детектор

¹ W. W. Yau, C. R. Ginnard, and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.*, **149**, 465 (1978).

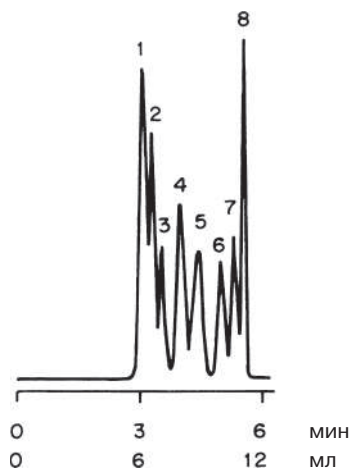


Рис. 15.10. Разделение смеси полистиролов с широким распределением масс (с разрешения R.V. Vivilecchia, B.G. Lightbody, N.Z. Thimot and H.M. Quinn, *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 424 (1977)). Подвижная фаза дихлорметан, скорость потока 2 мл/мин. Молекулярные массы: 1 — 2 145 000; 2 — 411 000; 3 — 170 000; 4 — 51 000; 5 — 20 000; 6 — 4000; 7 — 600; 8 — 78 (бензол)

фаза должна проходить через колонки в соответствии с возрастанием диаметра пор у сорбентов, их наполняющих¹.

15.5. Фазовые системы

Подвижные и стационарные фазы должны удовлетворять трем условиям:

- а) образец должен легко растворяться в подвижной фазе;
- б) образец не должен никаким образом взаимодействовать с неподвижной фазой, например адсорбироваться на ней;
- в) подвижная фаза не должна разрушать стационарную.

Если эти три условия соблюдены, то эксклюзионная хроматография будет относительно беспроблемной, простой, легко приспособляемой и быстрой.

Подвижная фаза должна быть растворителем, в котором хорошо растворяется образец, и при этом быть совместимой со стационарной фазой. Например, колонки, упакованные μ Styragel, не должны вступать в контакт с водой, спиртами, ацетоном, этилметилкетонам или диметилсульфоксидом.

Если образец плохо растворяется в подвижной фазе, это может привести к нежелательному взаимодействию образца со стационарной фазой. Такие

¹ В настоящее время этого правила или не придерживаются, или располагают колонки в порядке уменьшения жесткости сорбента. См.: L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan *Introduction to Modern Liquid Chromatography* / Third Ed. John Wiley & Sons, Inc. 2010, p. 634, а также *The Effect of SEC Column Arrangement of Different Pore Sizes on Resolution and Molecular Weight Measurements*. Roy Eksteen, Howard G. Barth, Bruce Kempf *LCGC North America*. Volume 29, Issue 8, pp. 668—671. — *Прим. пер.*

взаимодействия могут приводить к уширению заднего фронта пиков и сопровождаться увеличением времени элюции. Если компонент образца выходит позже V_0 , то это свидетельствует о том, что он каким-либо образом удерживается на стационарной фазе. Адсорбционные эффекты с участием пористого стекла и силикагеля совсем не редкость. Для разделения биополимеров часто выбирают модифицированный силикагель (например, диол- или глицеропропил-), предпочитая его немодифицированной форме, поскольку известно, что биополимеры очень полярны, для них очень большое значение имеет ионная сила и pH подвижной фазы. Оптимальные параметры могут быть определены опытным путем.

Адсорбционные эффекты могут быть уменьшены, если использовать элюенты, химически родственные стационарным фазам, например толуол в случае стиролдивинилбензолных колонок¹.

Для предотвращения уширения заднего фронта пиков в водные системы может быть добавлен детергент. Кроме того, для подавления роста микроскопических грибов в подвижную фазу добавляют фунгицид. Газы и суспендированные вещества могут сделать эксклюзионную колонку полностью непригодной.

Чем меньше размер частиц стационарной фазы, тем больше пиковая емкость колонки² и тем быстрее и эффективнее будут проходить разделения³.

Эксклюзионную хроматографию в общем случае можно классифицировать, используя в качестве критерия подвижные фазы, на следующие виды: гель-фильтрационная (ГФХ) (в случае водных элюентов) и гель-проникающая (ГПХ) (в случае органических элюентов).

15.6. Приложения

Эксклюзионная хроматография является важным методом разделения. Она открывает удобный путь к решению многих видов задач и сама по себе является неотъемлемой частью лабораторного ВЭЖХ-инструментария. Существует четыре основные области ее применения.

а) Как дополнение к другим ВЭЖХ-методам. Поскольку доступны колонки, для которых молекулярная масса 20 является порогом проницаемости, то эксклюзионная хроматография может рассматриваться как эффективный метод разделения маленьких молекул^{4,5}. Затраты на процесс невелики и сопоставимы с газовой хроматографией, в препаративном варианте даже ниже. Во всех случаях, когда молекулярные массы компонентов образца различаются более чем на 10 %, следует принимать во внимание эксклюзионную хроматографию.

¹ Обсуждение возможных эффектов, не являющихся эксклюзией, так же как и способы их устранения, были даны в работе S. Mori, in *Steric Exclusion Liquid Chromatography of Polymers*, J. Janca, ed., Dekker, New York, 1984, pp. 161—211.

² H. Engelhardt and G. Ahr, *J. Chromatogr.*, **282**, 385 (1983).

³ G. Guiochon and M. Martin, *J. Chromatogr.*, **326**, 3 (1985).

⁴ См., например, R. A. Grohs, F. V. Warren and B. A. Bidlingmeyer, *J. Liquid Chromatogr.*, **14**, 327 (1991).

⁵ Из-за ряда сложностей и развития других, более эффективных методов разделения этот метод в настоящее время редко применяется. — *Прим. пер.*

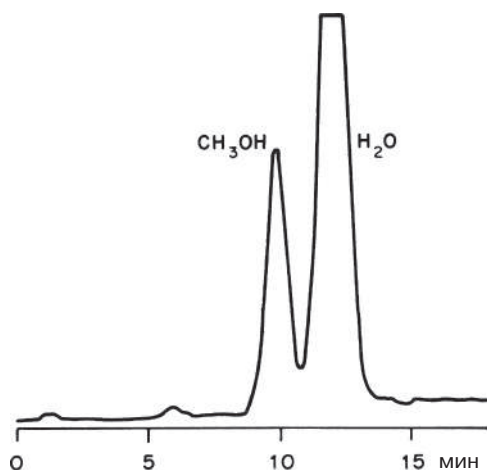


Рис. 15.11. Определение метанола и воды в тетрагидрофуране [воспроизводится с разрешения из R.K. Bade, L.V. Benningfield, R.A. Mowery and E.N. Fuller, *Int. Lab.*, **11**(8), 40 (1981)]. Условия: образец 40 мкл ТГФ с 1 % метанола и 1 % воды, колонка 250×7,7 мм, сорбент OR-PVA-500, подвижная фаза ТГФ, скорость потока 1 мл/мин, температура 50°C, детектор по диэлектрической проницаемости

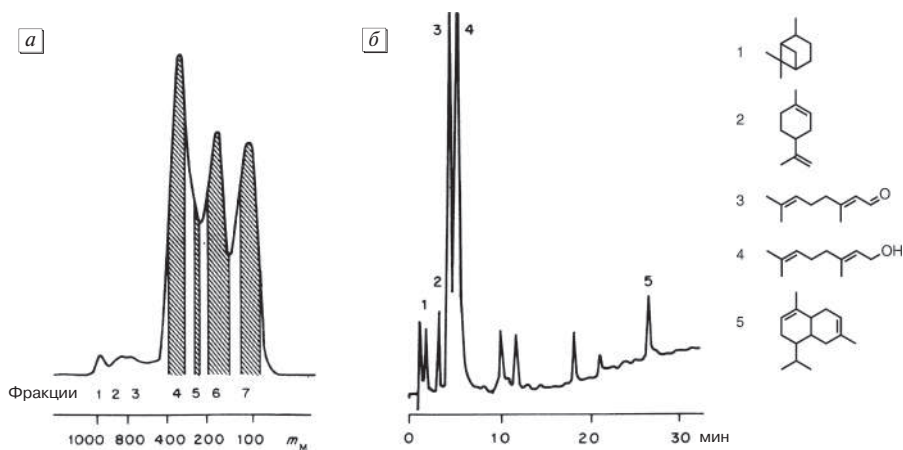


Рис. 15.12. (а) Эксклюзионная хроматограмма фруктового сока [J.A. Schmit, R.C. Williams and R.A. Henry, *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 551 (1973)]. Условия: колонка 1 м×7,9 мм, сорбент Bio-Beads SX-2, подвижная фаза хлороформ, скорость потока 0,8 мл/мин, УФ-детектор, 254 нм. (б) Обращенно-фазовая хроматограмма шестой фракции. Условия: колонка 1 м×2,1 мм, сорбент Permaphase ODS, подвижная фаза — метанол в воде, градиент от 5 до 100 % со скоростью 3%/мин, УФ-детектор, 254 нм. Пики: 1 — пинен; 2 — лимонен; 3 — нераль; 4 — гераниаль; 5 — кадинен

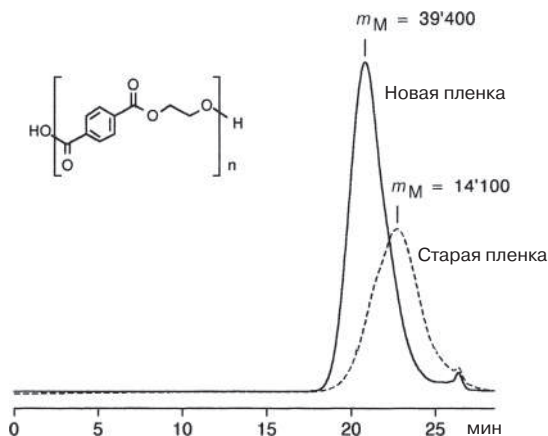


Рис. 15.13. Анализ синтетических полимеров на примере новой и старой полистирольной пленки (по материалам Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research, St. Gallen). Условия: образец полиэтилентерефталат, растворенный в гексафторизопропанол; колонки: четыре колонки 250×7 мм, сорбент Hibar LiChrogel PS 1, PS 20, PS 400 и PS 4000 последовательно, 10 мкм, подвижная фаза хлороформ — гексафторизопропанол (98:2), скорость потока 1 мл/мин, температура 35°C, УФ-детектор, 254 нм

Определение метанола и воды в тетрагидрофуране (рис. 15.11) показывает, насколько этот метод эффективен.

б) Разделение сложных смесей вместо их обработки или очистки. Примерами могут быть удаление солей и других низкомолекулярных соединений из биологических образцов; удаление пластификаторов из синтетических полимеров; анализ составляющих жевательной резинки после предварительного разделения на полимерную составляющую (каучук), пластификатор и вкусовую добавку. Хороший пример такого подхода дает анализ фруктового сока — с помощью гель-проникающей хроматографии его можно разделить на семь фракций (рис. 15.12а). Фракция 6 представляла собой апельсиновое масло и была подвергнута дальнейшему анализу на колонке с обращенной фазой (рис. 15.12б).

в) Анализ синтетических полимеров (пластиков). С помощью гель-проникающей хроматографии можно судить о том, идет ли реакция полимеризации, как ожидалось, удовлетворяет ли исходное сырье требованиям, имеют ли конечные продукты требуемые характеристики из-за получившегося распределения молекулярных масс. На рис. 15.13 сравнивается новая полиэтилентерефталатная пленка (Trevira®) и старая (подвергавшаяся действию атмосферы в течение года). Средняя длина полимерных цепей значительно сократилась. Факт, свидетельствующий об этом, — существенное уменьшение предела прочности на разрыв (18% от исходной величины). Имея соответствующее программное обеспечение, легко можно определить полидисперсность из среднемассовой молекулярной массы M_w и среднечисленную молекулярную массу M_n .

г) Характеризация образцов биологического происхождения (качественный и количественный анализ, препаративное выделение индивидуальных белков) (рис. 15.14).

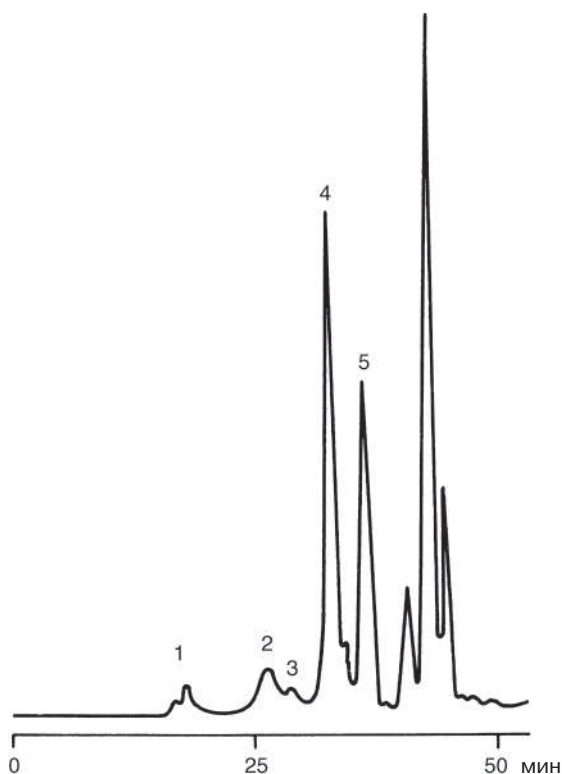


Рис. 15.14. Разделение белков молока [воспроизводится с разрешения из В. В. Gupta, *J. Chromatogr.*, **282**, 463 (1983)]. Условия: образец 100 мкл сыворотки сырого обезжиренного молока (казеин осаждали при pH 4,6), колонка 60 см × 7,5 мм, сорбент TSK 3000 SW (силикагель 10 мкм), подвижная фаза — буфер, содержащий 0,1 М NaH_2PO_4 , 0,05 М NaCl и 0,02 % NaN_3 (pH 6,8), скорость потока 0,5 мл/мин, УФ-детектор, 280 нм. Пики (с молекулярными массами): 1 — высокомолекулярные белки; 2 — γ -глобулин (150 000); 3 — бычий сывороточный альбумин (69 000); 4 — β -лактоглобулин (35 000); 5 — α -лактальбумин (16 500); другие компоненты не идентифицированы

ГЛАВА 16

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

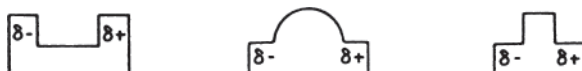
16.1. Механизм¹

Аффинная хроматография — один из самых специфичных хроматографических методов. В ее основе лежит биохимическое взаимодействие, например:

антиген	↔	антитело
фермент	↔	ингибитор
гормон	↔	носитель

Высокоспецифичная природа этих взаимодействий обусловлена тем фактом, что два соединения, принимающие в нем участие, идеально подходят друг другу как пространственно, так и благодаря электростатическому связыванию. Один из компонентов (лиганд) связан с подложкой (так же как химически связана привитая фаза с силикагелем), а другой (образец) адсорбируется из раствора (рис. 16.1). Процесс при этом обратим.

Если в растворе присутствуют другие компоненты, например:



они не связываются с лигандом, так как не подходят ему.

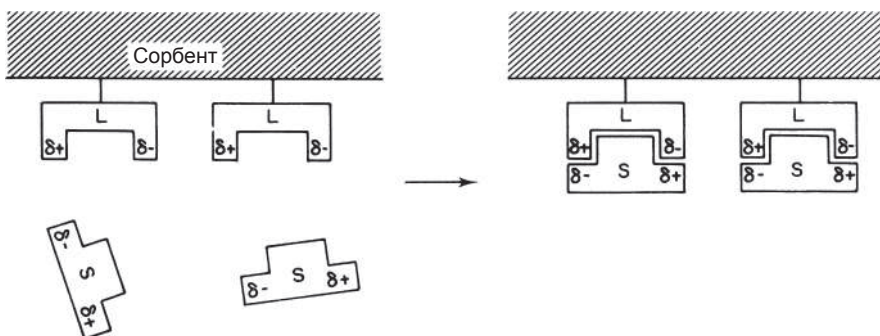


Рис. 16.1. Принцип связывания в аффинной хроматографии. L — лиганд; S — образец. $\delta+$ и $\delta-$ показывают частичный заряд (меньше одного элементарного заряда)

¹ R.R. Walters, *Anal. Chem.*, **57**, 1099A (1985); N. Cooke, *LC GC Mag.*, **5**, 866 (1987); K. Jones, *LC GC Int.*, **4**(9), 32 (1991).

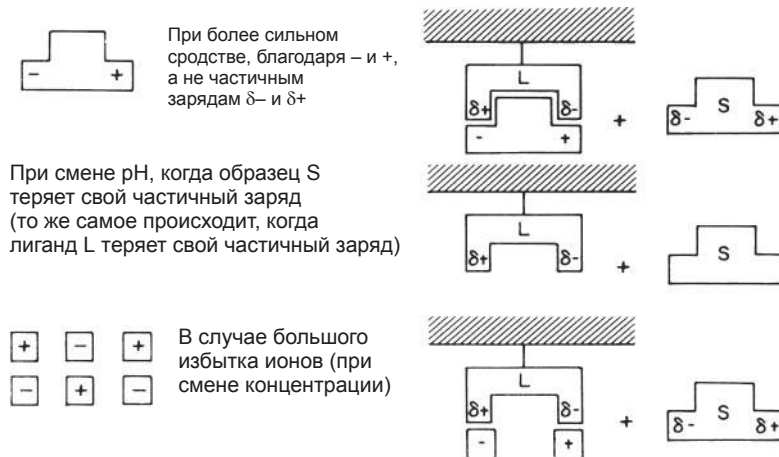


Рис. 16.2. Варианты элюирования в аффинной хроматографии

Вещество $\delta^- \text{S} \delta^+$ селективно задерживается неподвижной фазой, в то время как другие молекулы (белки, ферменты и т.п.) вымываются элюентом. Теперь вещество очищено от примесей. Однако оно не может быть выделено до тех пор, пока не будет десорбировано с неподвижной фазы. Это осуществляется элюированием раствором, содержащим вещество, имеющее большее сродство к лиганду, или при изменении pH или ионной силы. Так как любое биохимическое взаимодействие имеет место только при вполне конкретных условиях, очевидно, что изменение pH или ионной силы раствора может легко разрушить специфическое взаимодействие.

Вещество $\delta^- \text{S} \delta^+$ может быть элюировано так, как показано на рис. 16.2.

16.2. Аффинная хроматография как частный случай ВЭЖХ¹

Аффинная хроматография отличается от других хроматографических методов тем, что подходящая неподвижная фаза может селективно сорбировать один или несколько компонентов из произвольной смеси веществ благодаря возникающей между ними (неподвижной фазой и компонентами) биоспецифической связи. Подходящий вариант элюции в дальнейшем позволяет получить чистое(ые) вещество(а).

В некоторых случаях даже нет необходимости использовать колонку для сорбции целевого вещества и аффинную хроматографию проводят на мембранах или дисках². Впрочем, классические колонки, когда элюент поступа-

¹ P. O. Larsson, *Methods Enzymol.*, **104**, 212 (1984); G. Fassina and I. M. Chaiken, *Adv. Chromatogr.*, **27**, 247 (1987); K. Ernst-Cabrera and M. Wilchek, *TrAC*, **7**, 58 (1988); A. F. Bergold, A. J. Muller, D. A. Hanggi and P. W. Carr, in *HPLC Advances and Perspectives*, vol. 5, C. Horvath (ed.), Academic Press, New York, 1988, с. 95—209.

² M. Peterka et al., *J. Chromatogr. A*, **1109**, 80 (2006).

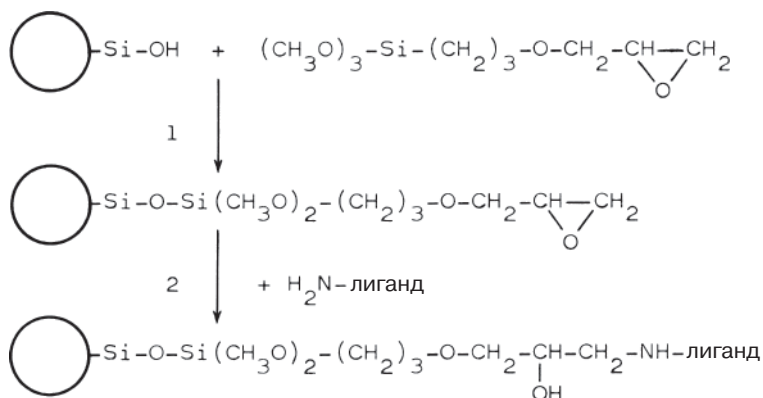


Рис. 16.3. Реакция поверхностных силанольных групп силикагеля с γ -глицидоксипропилтриметоксисиланом для получения активированного эпоксихиликагеля (шаг 1) и последующее присоединение лиганда (шаг 2). Лиганд должен быть амином. Обе реакции идут при комнатной температуре

ет под действием сил гравитации, предоставляют больше возможностей для разделения. Эта глава, однако, ограничивается описанием разделения на высокоэффективной неподвижной фазе (10 мкм и меньше), где можно довольно быстро осуществлять процесс разделения. Для этих целей могут быть использованы очень маленькие колонки.

Неподвижная фаза¹ для аффинной хроматографии может быть приготовлена самим пользователем, как правило, из диол- или аминосиликагеля. Однако гораздо проще купить уже активированный силикагель, который позволит пришить требуемый лиганд в соответствии с хорошо известными методиками. Один из вариантов активации и сшивки показан на рис. 16.3. Уже готовые стационарные фазы с наиболее часто используемыми лигандами коммерчески доступны. Большинство фаз получают, используя длинные цепочки (так называемые спейсеры) между силикагелем и лигандом, чтобы гарантировать легкий доступ молекул образца к местам взаимодействия с лигандом.

Связанное/сорбированное вещество может быть элюировано с помощью градиента (рН, раствора с большой ионной силой или с помощью образца, имеющего большее сродство к лиганду) или «толчком». Последний является обычным приемом в аффинной хроматографии. Соединение, разрывающее связь вещества с лигандом, вводится в элюент, что приводит к десорбции аналита.

Количество образца ограничивается лишь емкостью неподвижной фазы в колонке. Выход биологически активных белков зачастую достигает 100%. Это означает, что денатурация и необратимая адсорбция во многих случаях ничтожно малы.

¹ N.E. Labrou, *J. Chromatogr. B*, **790**, 67 (2003); J.E. Schiel et al., *J. Sep. Sci.*, **29**, 719 (2006).

16.3. Применение

Лиганды на основе *анти-IgG*¹ селективно связываются со всеми антителами класса IgG. Синтез неподвижной фазы, необходимой для разделения IgG, описан в работе, указанной в подписи к рис. 16.4. Подвижная фаза изначально представляет собой буфер с pH 7,4, а дальнейший переход на буфер с pH 2,2 позволяет разрушить связь сорбент-IgG и смыть последний с колонки. Так как специфическая флуоресценция IgG гасится при pH 2,2, pH элюата необходимо повысить до 8. Выход активного IgG при таком разделении превышает 97 %. Хранение колонки при температуре +4 °С, когда она не используется, позволяет стационарной фазе оставаться активной длительное время.

Лектины — белки растительного происхождения, селективно связывающие гексозы и гексозамины. Конканавалин А — лектин, широко используемый в аффинной хроматографии для выделения гликопротеинов, гликопептидов и гликолипидов. Элюция целевого вещества инициируется «толчком» — введением раствора сахара. На рис. 16.5 показано разделение фермента пероксидазы (гликопротеина). Детектирование осуществляется одновременно на двух длинах волн: 280 нм (характерна для всех белков) и 405 нм (специфична для протогеминной группы пероксидазы).

Цибакрон голубой является популярным лигандом благодаря своей способности связывать большое количество различных ферментов, а также некоторые

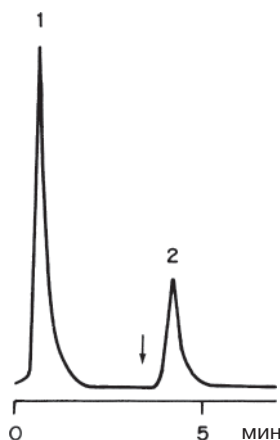


Рис. 16.4. Аффинная хроматография IgG [воспроизведено с разрешения J. R. Sportsman and G. S. Wilson, *Anal. Chem.*, **52**, 2013 (1980) © American Chemical Society]. Условия: образец — 10 мкл раствора, содержащего 14 мкг человеческого IgG; колонка — 40×2 мм; неподвижная фаза — анти-IgG привитый к LiChrospher Si 1000, 10 мкм; подвижная фаза — PBS (0,01 М фосфатный буфер, 0,15 М хлорид натрия, pH 7,4), скорость потока 0,5 мл/мин; стрелкой показано изменение состава буфера до 0,01 М фосфатного буфера pH 2,2; флуоресцентный детектор 283/335 нм. Пик 1 — неудерживаемые соединения; пик 2 — IgG

¹ IgG — иммуноглобулин G.

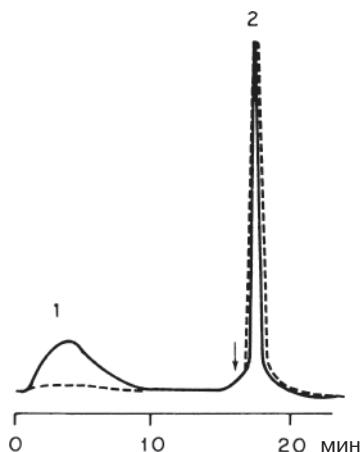


Рис. 16.5. Аффинная хроматография пероксидазы [А. Borchert, P.O. Larsson and K. Mosbach, *J. Chromatogr.*, **244**, 49 (1982)]. Условия: образец — 4,1 мл раствора с концентрацией белка 1 мкг/мл; колонка 50×5 мм; стационарная фаза — конканавалин А привитый к LiChrospher Si 1000, 10 мкм; подвижная фаза — 0,05 М ацетат натрия, 0,5 М хлорид натрия, 1 мМ хлорид кальция, 1 мМ хлорид магния, pH 5,1; стрелкой показан ввод 4,1 мл 25 мМ α -метил-D-гликозида; детектирование: сплошная линия — 280 нм, пунктирная — 405 нм. Пики: 1 — неудерживаемые белки (содержит менее 2 % пероксидазы) 2 — пероксидаза

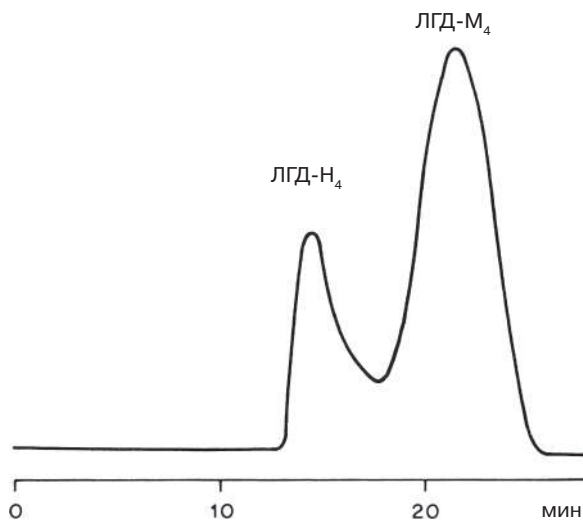


Рис. 16.6. Разделение изоферментов Н4 и М4 ЛДГ. [C.R. Lowe, M. Glad, P.O. Larsson, S. Ohlson, D.A.P. Small, T. Atkinson and K. Mosbach, *J. Chromatogr.*, **215**, 303 (1981)]. Условия: образец 1,3 мкг ЛДГ-Н₄ и 11,8 мкг ЛДГ-М₄; колонка 100×5 мм; стационарная фаза — цибакрон голубой F3G-A привитый к LiChrosorb Si 60, 5 мкм; подвижная фаза — 1 мл/мин калий-фосфатный буфер pH 7,5; через 3 мин после начала элюирования градиент 0—4 мМ НАДН; детектирование по ферментативной активности, УФ 340 нм



белки крови¹. Его также часто относят к псевдоаффинным лигандам, так как, по сути, этот синтетический триазиновый краситель не относится к природным молекулам. Он во многих случаях довольно сильно снижает активность элюируемых ферментов. Одним из преимуществ цибакрона голубого является его низкая стоимость. На рис. 16.6 показано разделение изоферментов H4 и M4 ЛДГ (лактатдегидрогеназы) в градиенте НАДН (восстановленного никотинамидадениндинуклеотида). В качестве детектора активности фермента (см. раздел 19.8) использовали постколоночный реактор.

Антитела, так же как и антигены, могут быть использованы в качестве лигандов. Этот вариант также часто относят к иммунно-аффинной хроматографии².

¹ M. D. Scawen, *Anal. Proc. (Lond.)*, **28**, 143 (1991).

² T. M. Phillips, in *High Performance, Liquid Chromatography of Peptides and Proteins*, C. T. Mant and R. S. Hodges, eds, CRC Press, Boca Raton, 1991, с. 507; G. W. Jack, *Mol. Biotechnol.*, **1**, 59 (1994).

17.1. Различные варианты и возможности

Не так уж и сложно выбрать подходящий метод разделения из всех, ранее перечисленных.

Маленькие нейтральные молекулы могут быть разделены с помощью адсорбционной или обращенно-фазовой хроматографии на химически связанных фазах. Бывает, что в ряде случаев сложно выбрать между различными вариантами (в общем случае, между разделением на нормальной и обращенной фазах), несмотря на то, что вы ознакомились со всеми рассмотренными в предыдущих главах методами. Если все же сомнения в действенности способа разделения остаются (как, например, при выборе в качестве стационарной фазы силикагеля или привитого к силикагелю октадецилсилана), тогда нужно просто попробовать. Лучше начать с подвижной фазы, обладающей достаточно сильной элюирующей способностью. Большинство веществ при использовании обращенной фазы C18 можно смыть с колонки градиентом 10—90 % метанола или ацетонитрила в воде¹. Информация о составе подвижной фазы в момент выхода вещества с колонки поможет подобрать подходящий вариант для элюирования в изократическом² режиме³. Как уже отмечалось в разделе 4.7, образец должен хотя бы частично растворяться в подвижной фазе.

Ионные образцы разделяются с помощью метода ионообменной, ионной или ион-парной хроматографии. Разделение на обращенной фазе (как уже объяснялось в разделе 10.5) может быть использовано в качестве альтернативы.

Если молекулы в анализируемой смеси ощутимо различаются по размерам, имеет смысл попробовать *эксклюзионную хроматографию* (гель-фильтрацию в случае полярных образцов и гель-проникающую в случае неполярных).

Молекулы с массой более 2000⁴, как правило, возможно разделить только методом эксклюзионной хроматографии (для биомолекул, возможно, подойдет аффинная хроматография).

Аффинная хроматография подходит для решения специфических биологических задач. Предварительное изучение вопроса о сродстве молекулы

¹ A. Ceccato et al., *Organic Process Res. Dev.*, **11**, 223 (2007).

² Изократический — проведенный при постоянных условиях разделения без градиента (особенно без градиента растворителя).

³ A. C. J. H. Drouen, H. A. H. Billiet, P. J. Schoenmakers and L. de Galan, *Chromatographia*, **16**, 48 (1982).

⁴ Скорее 50000 и более. — *Прим. пер.*



к тому или иному лиганду является обязательным для правильного выбора последнего.

Относительно легколетучие вещества (температура кипения которых ниже $+350^{\circ}\text{C}$) лучше всего разделяются с помощью газовой хроматографии при условии, что не происходит разложение образца при выбранной температуре.

Чем больше известно о физических и химических свойствах образца, тем выше шанс выбрать правильные подвижную и неподвижную фазы (и наиболее подходящий детектор). Это позволит гарантировать успех с самого начала¹. Каждое успешное разделение добавляет химику-аналитику опыта. В некоторых случаях выбор метода может быть сделан при помощи автоматизированных экспертных систем².

Лаборатория ВЭЖХ, работающая с широким спектром задач, должна иметь следующие неподвижные фазы:

- а) силикагель;
- б) силикагель с привитым октадецилсиланом или октилсиланом;
- в) сильный катионообменник;
- г) сильный анионообменник;
- д) колонки с сорбентом для гель-фильтрации с подходящим размером пор для решаемых задач;
- е) колонки с сорбентом для гель-проникающей хроматографии с подходящим размером пор для решаемых задач;
- ж) возможно, несколько химически модифицированных фаз с привитыми amino- или нитрильными группами.

Для ряда важнейших классов соединений доступны специализированные неподвижные фазы.

Таблицы в данной главе предназначены для помощи в выборе фаз, хотя они и не гарантируют оптимального разделения. Некоторые задачи можно решить с использованием методов, которые не предлагались для таких случаев.

Многие неподвижные фазы могут быть предварительно протестированы с помощью ТСХ, как упомянуто в разделе 9.4. Это может оказаться очень полезным³.

Помните о ключевых задачах для каждого класса неподвижных фаз:

- а) силикагель — разделение изомеров;
- б) неполярные химически связанные фазы — разделение гомологов;
- в) полярные химически связанные фазы — разделение веществ с различными функциональными группами.

Рекомендации по разделению смесей неизвестного состава

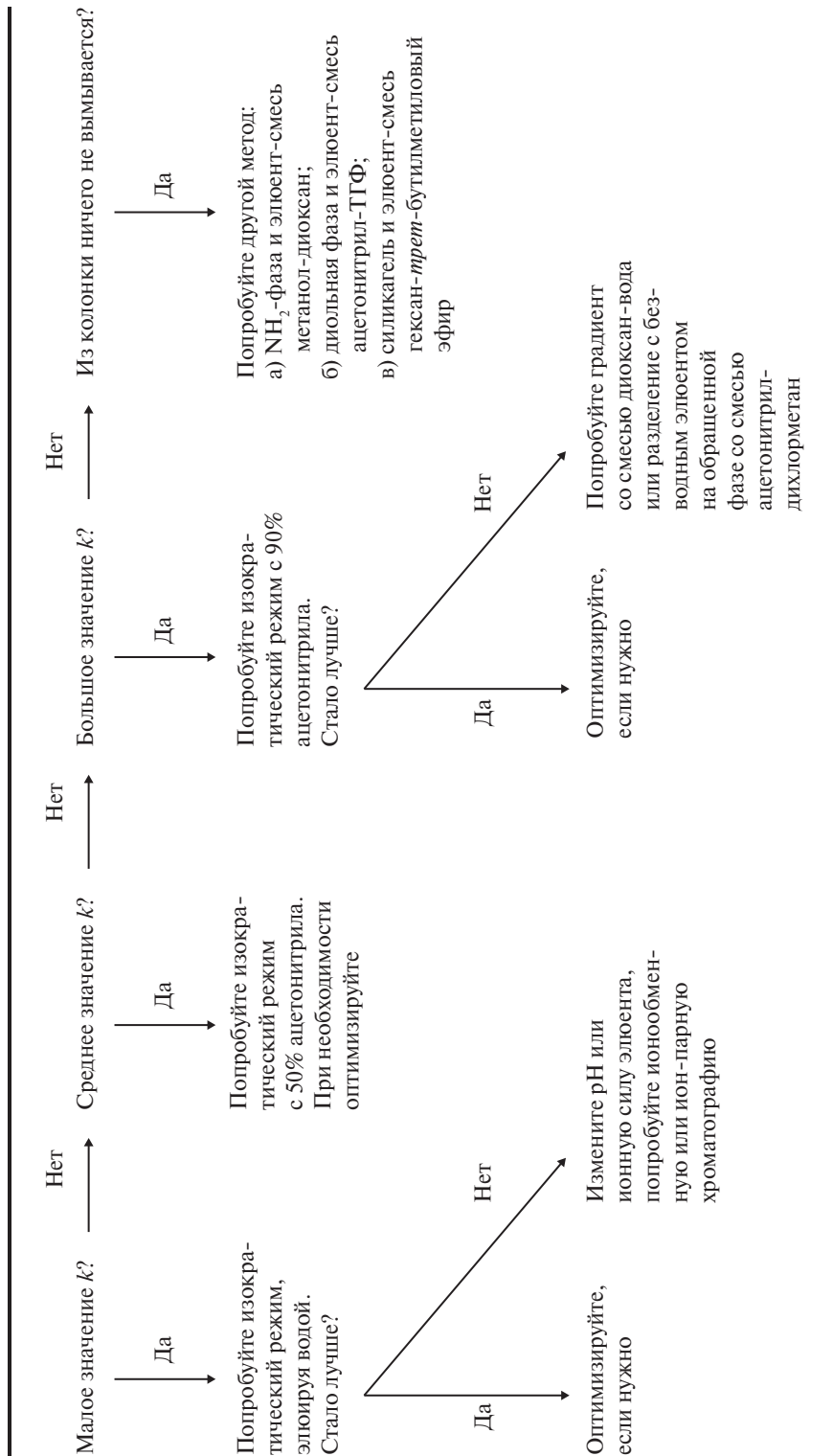
В табл. 17.1 показана схема оптимизации разделения смеси неизвестного состава в соответствии с рекомендациями компании Hewlett-Packard (ныне Agilent). Образец должен быть введен в колонку, упакованную обращенной фазой, и элюирован градиентом 10—90 % ацетонитрил/вода.

¹ B. Serkiz et al., *LC GC Int.*, **10**, 310 (1997).

² M. Peris, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **26**, 219 (1996).

³ P. Renold, E. Madero and T. Maetzke, *J. Chromatogr. A*, **908**, 143 (2001).

Таблица 17.1. Схема разделения смеси неизвестного состава (Hewlett-Packard). Градиент 10—90 % ацетонитрила в воде на октадецилсилиановой колонке



Выбор метода разделения

В табл. 17.2 показан подбор метода разделения для различных классов соединений (Varian).

После выбора метода разделения необходимо будет провести его оптимизацию, что особенно важно для рутинных анализов. Рисунок 17.1 демонстрирует этапы этой оптимизации (обратите внимание на времена удерживания на гипотетических хроматограммах!). Скорее всего, первое разделение не будет успешным. В приведенном примере только пик 5 подходит для количественного анализа, и сделать какие-либо выводы о количестве компонентов в смеси невозможно (пик 0 — «мертвый» объем). Первой задачей является оптимизация времен удерживания. В большинстве случаев это не очень сложно. Чем сложнее хроматограмма, тем больше будет величина k_{\max} . Наиболее сложный этап — оптимизация селективности¹. Об этом говорится в главе 18. На рис. 17.1 порядок элюирования веществ изменился по сравнению с первой хроматограммой (если подходящей селективности достичь не удастся, то метод разделения был выбран неправильно). Для единичного анализа проблема разделения решена, в других случаях рекомендуется провести дополнительную оптимизацию метода разделения. При оптимизации селективности не удалось сократить время анализа с 600 до 30 с, но разрешение пиков при этом достаточно низкое. Возможно, воспроизводимость метода тоже снизилась, что означает — метод разделения будет чувствителен к воздействию внешних факторов (см. раздел 18.6). В конце требуется провести валидацию, если метод планируется использовать для контроля качества (см. раздел 20.3).

17.2. Перенос методики²

Перенос методики из одной лаборатории в другую (от разработки к рутинным анализам, от производителя к пользователю и т. п.) может оказаться сложной задачей, так как на разделение методом ВЭЖХ влияет очень много параметров. На новом месте разрешение критичных пиков может быть хуже, чем требуется, или вообще вся хроматограмма может выглядеть иначе. Для предотвращения таких сюрпризов необходимо стараться как можно более детально описывать всю методику: размеры колонки, неподвижную фазу (может быть, даже номер партии), подготовку подвижной фазы (может быть важна последовательность смешения компонентов), температуру, объемную скорость потока, внеколоночный объем оборудования, объем задержки в случае градиентного разделения (см. раздел 4.3), так же как и параметры детектирования и интегрирования. Может быть полезным указать неподвижные фазы, схожие по свойствам с используемой, как это, например, показано на рис. 10.9. Реальная температура в термостате для колонок должна контролироваться, так как может отличаться

¹ Как найти скрытые пики, см.: J. Pellett et al., *J. Chromatogr. A*, **1101**, 122 (2006).

² J. J. Kirschbaum, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7**, 813 (1989); D. Guilleme, J. L. Veuthey and V. R. Meyer, *LC GC Eur.*, **21**, 322 (2008); F. Bernardoni et al., *Chromatographia*, **70** 1561 (2009).



ся от требуемой! Методические указания также требуют детального описания пробоотбора, хранения проб и пробоподготовки.

В случае, если осуществляется перенос методики на колонку с диаметром d_c , отличным от исходного, скорость потока F должна быть скорректирована для получения одинаковых времен удерживания:

$$F_2 = \frac{F_1 \cdot d_{c,2}^2}{d_{c,1}^2}.$$

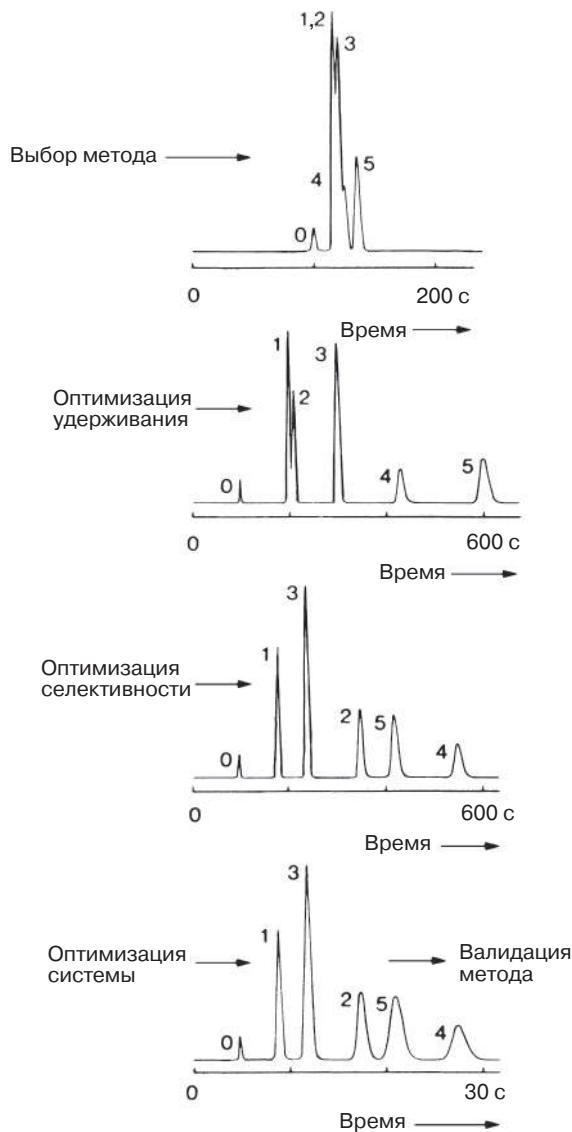


Рис. 17.1. Способ оптимизации метода [с разрешения P.J. Schoenmakers, A. Peeters and R.J. Lynch, *J. Chromatogr.*, **506**, 169 (1990)]

Единственный параметр, который следует принять во внимание, — отношение квадратов диаметров колонок. Если различается и размер частиц d_p , то скорость потока должна быть скорректирована в соответствии с кривой Ван-Деемтера, так как переносимый процесс разделения должен протекать с той же приведенной скоростью v , что и ранее (желательно оптимальной). Чем меньше размер частиц, тем выше должна быть линейная скорость потока, так как v пропорциональна их диаметру. В разделе 8.5 было показано, что $v = (d_p \cdot u) / D_m$. Поэтому для сохранения той же v необходимо, чтобы $d_p \cdot u$ не изменялось. Это повлечет за собой существенный рост давления. На рис. 7.3 размер частиц был уменьшен с 10 до 3 мкм, что позволило уменьшить длину колонки примерно в 3 раза, сохранив исходное число теоретических тарелок (обратите внимание на то, что в этом случае требуется также корректировка внеколоночного объема всей ВЭЖХ-системы). Несмотря на уменьшение длины колонки, давление увеличилось в 10 раз при фиксации приведенной скорости потока v , что показано на рис. 7.3. Польза от данных изменений заключается в уменьшении требуемого времени разделения в 10 раз по сравнению с исходным.

Если происходит одновременное изменение как размера частиц, так и размера колонки, то для расчета скорости потока необходимо использовать следующую формулу:

$$F_2 = \frac{F_1 \cdot d_{c,2}^2 \cdot d_{p,1}}{d_{c,1}^2 \cdot d_{p,2}}.$$

Задача 33

Старый метод требовал колонки диаметром 4,6 мм с 5-мкм сорбентом. Работа велась при скорости 1,5 мл/мин. Сейчас планируется использовать 2-мм колонку с 3-мкм сорбентом. Какая скорость потока требуется?

Решение

$$F_2 = \frac{1,5 \cdot 2,0^2 \cdot 5}{4,6^2 \cdot 3} \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1} = 0,47 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1} \approx 0,5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}.$$

При такой адаптации методики, как правило, не требуется проводить повторную валидацию, как описано в разделе 20.3 (также не требуется и перепроверка линейности). Документация, демонстрирующая, что эксплуатационная аттестация (ЭА) по-прежнему соответствует действительности и, таким образом, качество хроматографической очистки не ухудшилось, послужит достаточным основанием.

ГЛАВА 18

ПРОБЛЕМЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

18.1. Проблема элюирования

В большинстве случаев при разделении сложных образцов, содержащих более 20 веществ, возникают проблемы. В изократическом режиме (рис. 18.1) у пиков, элюируемых первыми, скорее всего, будет низкое разрешение, а последние пики, вероятно, окажутся размытыми, пологими и, возможно, «затеряются»

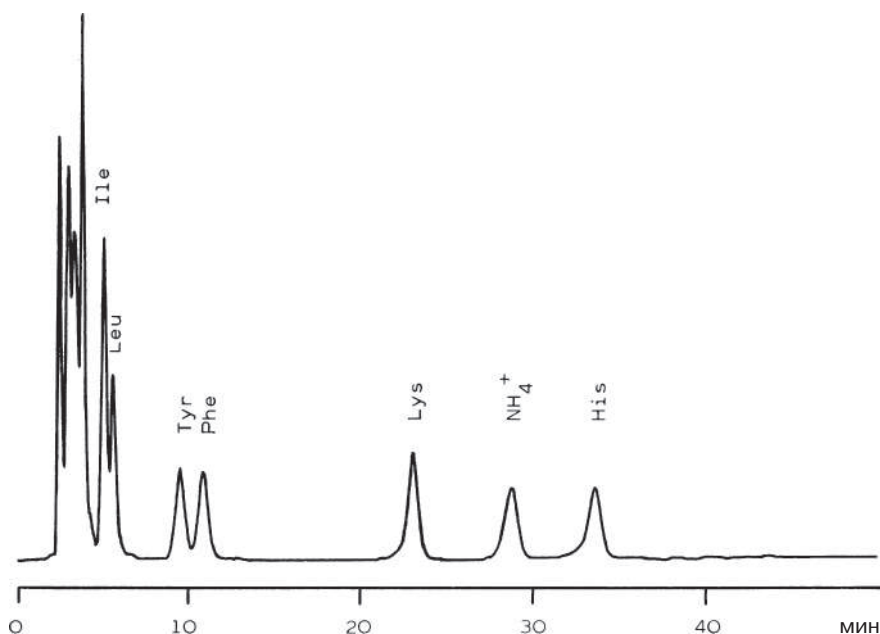


Рис. 18.1. Изократическое разделение 17 аминокислот, пики, элюируемые первыми, недостаточно разрешены, а последняя аминокислота так и осталась на колонке (печатается с разрешения A. Serban, Isotope Department, Weizmann Institute of Science, Rehovot). Условия: 50 мкл образца, содержащего 5 нмоль каждой аминокислоты, постколоночная дериватизация нингидрином, колонка Amino Pac Na-2 (катионообменник) 150×4 мм, 7 мкм, подвижная фаза цитрат натрия 0,2 N pH 3,15 — фосфат натрия 1 N pH 7,4 (1:1), скорость потока 0,4 мл/мин, температура 55 °C, детектирование в видимой области 520 нм

среди фонового шума. Использование слабого элюента улучшит разрешение первых пиков, но при этом последние не будут элюироваться с колонки. При использовании сильного элюента пики, выходящие с колонки первыми, станут настолько скученными, что их будет очень сложно различить.

Это «общая проблема элюирования» и вот несколько путей ее решения:

- а) градиент растворителя;
- б) переключение колонок;
- в) градиенты температуры и скорости потока¹;
- г) комплексная двумерная ВЭЖХ.

Все перечисленные выше способы позволяют увеличить расстояния между рано элюируемыми пиками и ускорить элюирование последних, так, что они становятся ближе друг к другу.

В эксклюзионной хроматографии практически нет проблем с элюированием, и это одно из ее главных преимуществ. Она, наоборот, гарантирует элюцию всех пиков. При этом последние пики выходят с полным объемом колонки, который равен ее полному объему пустот. Единственное исключение при наличии адсорбционных эффектов — пики могут элюироваться позже мертвого объема, хотя и этого можно избежать, тщательно подбирая подвижную фазу и сорбент.

18.2. Градиенты²

При разработке методики в ОФ-ЖХ и ИОХ обычно сначала используют так называемый разведочный градиент. Он представляет собой линейное увеличение количества сильного компонента подвижной фазы от 10 до 100 %. (Ранее уже говорилось о том, что в обращенно-фазовой хроматографии не рекомендуется использовать 100 % А, поскольку это может привести к коллапсу алкильных цепочек и медленному уравниванию колонки при добавлении в элюент органического растворителя.) После чего определяют, какой из режимов (градиентный или изократический) лучше. Делают это следующим образом³.

Если на разделение веществ уходит более 25 % градиентного времени, то считают, что лучшим или даже единственно возможным режимом является градиентный. Однако интервал %В может быть и меньше чем 10—100 %. Гипотетическая хроматограмма показана в верхней части рис. 18.2.

Если все вещества элюируются менее чем 25 % градиентного времени, тогда рекомендуют использовать изократический режим (нижняя часть рис. 18.2). Подходящую долю растворителя В определяют по хроматограмме.

В обоих случаях разделение зачастую требует оптимизации, т. е. поиска оптимальной селективности (изменения типа сорбента, растворителя В, добавок в подвижную фазу, температуры). Состав подвижной фазы в начале градиента

¹ T. Greibrokk and T. Anderson, *J. Sep. Sci.*, **24**, 899 (2001); B. A. Jones, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.*, **27**, 1331 (2005).

² P. Jandera, in: *Advances in Chromatography*, vol. 43, P. R. Brown et al., eds., Dekker, New York, 2005, pp. 1—108; L. R. Snyder and J. W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution*, Wiley-Interscience, Hoboken, 2007.

³ J. W. Dolan, *LC GC Int.*, **9**, 130 (1996) или *LC GC Mag.*, **14**, 98 (1996); J. W. Dolan, *LC GC Eur.*, **13**, 388 (2000) или *LC GC Mag.*, **18**, 478 (2000).

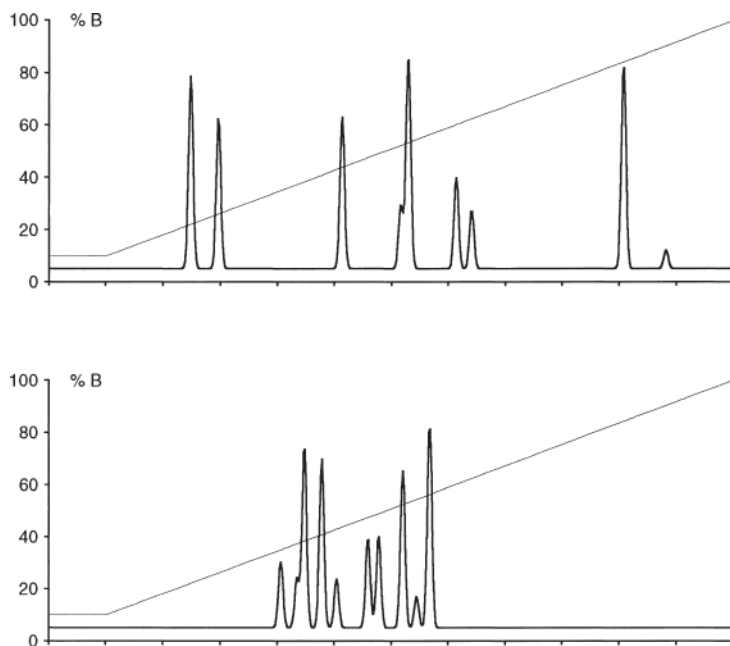


Рис. 18.2. Выбор между градиентным (вверху) и изократическим (внизу) режимами разделения с пробным градиентом 10—100 % В. Задержка в начале градиента компенсирует объем задержки системы. Гипотетические хроматограммы создавали с помощью компьютерного моделирования

должен быть таким, чтобы он приводил к элюции первых пиков. Затем состав элюента изменяется, в нем увеличивается доля сильного растворителя, благодаря чему из колонки будут вымываться сильно удерживаемые компоненты. На рис. 18.3 показано разделение 17 аминокислот в уже оптимизированных градиентных условиях.

Еще одним вариантом градиентного элюирования является *ступенчатый градиент*. Для его практического воплощения необходимы многоходовой кран и разные растворители. Переключение крана можно осуществлять вручную (например, когда разрабатывают методику) или с помощью компьютерной программы (рис. 18.4). По сравнению с непрерывным градиентом оптимизация ступенчатого не так уж и сложна, а качество разделения в конечном итоге не хуже¹. Однако возможно появление пиков-призраков в результате неполного смешения растворителей в месте их соприкосновения. И эта вероятность тем больше, чем больше разница в полярности растворителей. Для того чтобы распознать на хроматограмме пики-призраки в случае непрерывного или ступенчатого градиента, необходимо записать хроматограмму без ввода пробы.

¹ Спорное утверждение. См.: *Снайдер Ллойд Р., Долан Джон У. Высокопроизводительная градиентная элюция: практическое применение модели линейного изменения элюирующей силы растворителя*. Пер. с англ. М.: Техносфера. 2015. — *Прим. пер.*

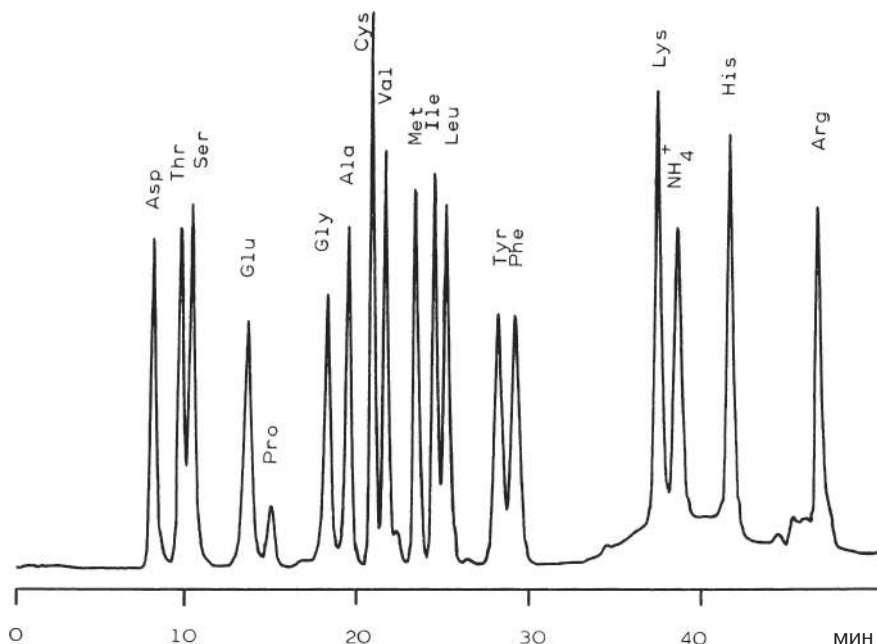


Рис. 18.3. Разделение аминокислотной смеси, представленной на рис. 18.1, в градиентном режиме (печатается с разрешения A. Serban, Isotope Department, Weizmann Institute of Science, Rehovot). Подвижная фаза: А — цитрат натрия 0,2 N pH 3,15, В — фосфат натрия 1 N pH 7,4, С — гидроксид натрия 0,2 N. Градиент: сначала 100% А в течение 9 мин, потом линейный градиент до 100% В за 25 мин, затем линейный градиент до 15% С за 18 мин. Все остальные условия перечислены на рис. 18.1

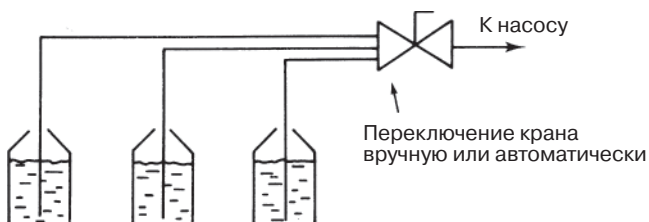


Рис. 18.4. Схема реализации ступенчатого градиента

В разделе 4.3 описаны варианты создания *непрерывных градиентов*. Состав растворителей в подвижной фазе может меняться линейно, кусочно-линейно, а форма градиента может быть вогнутой или выпуклой (рис. 18.5).

Вогнутые градиенты полезны для разделений в тех случаях, когда изменение силы подвижной фазы сильнее сказывается на удерживании второго компонента, чем первого. При этом добавление небольшого количества элюента В приводит к значительному изменению элюирующей силы подвижной фазы. Кроме того, для непрерывных градиентов также характерны пики-призраки. Поэтому все растворители, участвующие в процессе, должны быть чистыми,

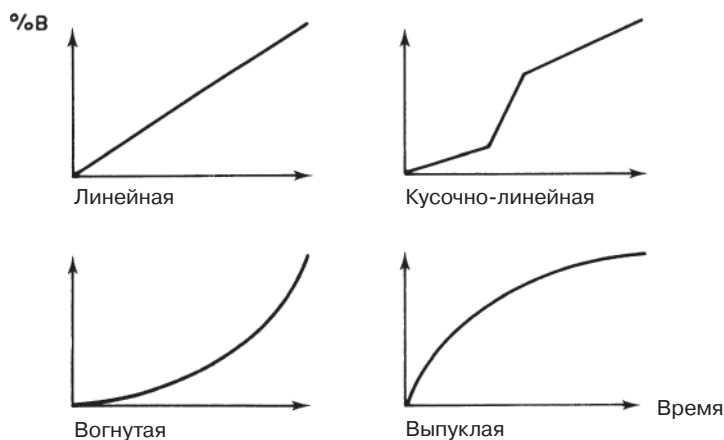


Рис. 18.5. Различные формы градиента

иначе даже следовые примеси будут адсорбироваться на колонке, а при нарастании доли растворителя В в элюенте они будут вымываться из нее, порождая тем самым пики-призраки. На рис. 18.6 изображен пример такой ситуации. Проводят эксперимент без ввода пробы с градиентом 20—100 % В за 10 мин (далее 100 % В). Условия: растворитель А — вода двойной дистилляции, растворитель В — ацетонитрил (Merck, ч. д. а.), скорость потока 1 мл/мин, сорбент Spherisorb ODS, 5 мкм, колонка 250×3,2 мм, УФ-детектор, длина волны 254 нм. Заключение: для этого эксперимента вода или ацетонитрил были низкого качества!

Рекомендуется эмпирически подбирать подходящий градиент (состав растворителей, продолжительность каждой ступени, профиль градиента), или придерживаясь определенных правил¹, или прибегая к помощи компьютера².

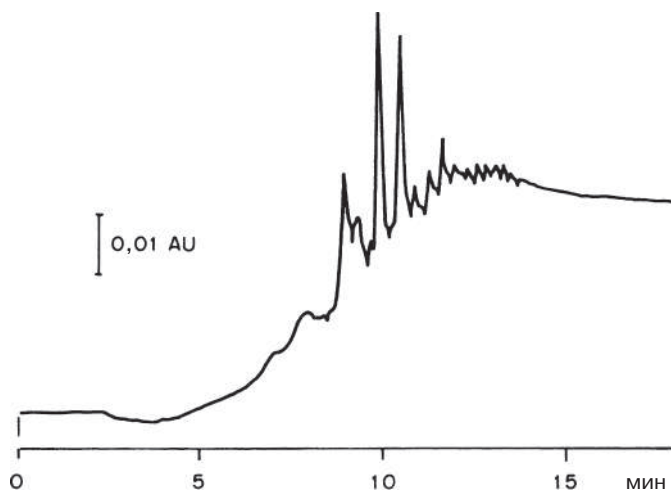


Рис. 18.6. Пики-призраки в градиентных разделениях

¹ P. Jandera, *J. Chromatogr.*, **485**, 113 (1989).

² B. F. D. Ghrist and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, **459**, 43 (1988).

Недостатком градиентного разделения является необходимость уравнивания колонки после каждого эксперимента. С химически связанными фазами, однако, все относительно просто — такая фаза снова готова к использованию после промывки пятью колоночными объемами слабого растворителя (А). Ну и, конечно, используемые растворители должны быть смешиваемы! Кроме того, во время работы в градиентном режиме рекомендуется обратить внимание на *объем задержки* хроматографической системы (раздел 4.3).

Во время градиентного элюирования поведение макромолекул отличается от поведения небольших молекул¹. На рис. 18.7 видно, что наклон прямой, соответствующий белку (или какой-либо другой макромолекуле), более крутой или, другими словами, так называемый параметр S графика $\log k = f(\%B)$ для

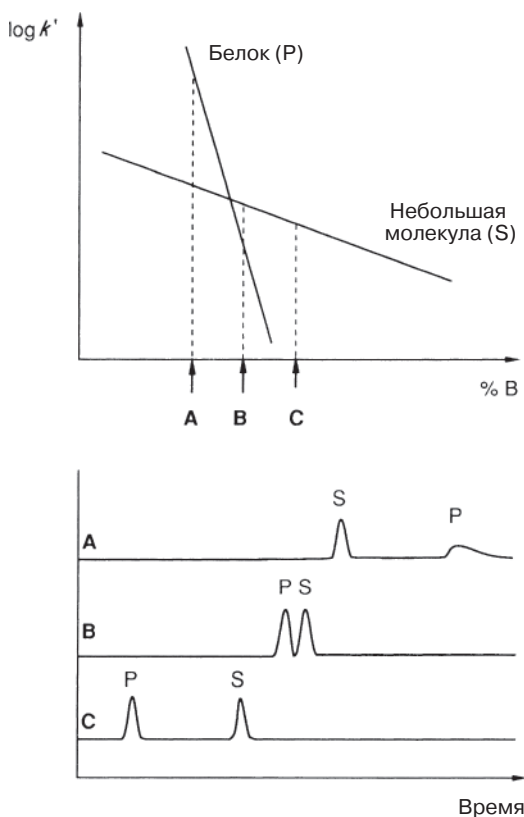


Рис. 18.7. Элюирование белков Р и небольших молекул S в зависимости от концентрации модификатора в подвижной фазе. На данном рисунке порядок выхода пиков представлен в виде зависимости от изменения %B (сильный элюент, но может быть и что-то другое). Наклон прямых есть величина S . Для соединения Р он большой, для S — маленький. Небольшие изменения %B оказывают ярко выраженное влияние на k белка

¹ D. W. Armstrong and R. E. Boehm, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 378 (1984).



крупных молекул гораздо больше, чем для малых. Это значит, что разделить смеси белков без использования градиента в обращенно-фазовой или ионообменной хроматографии невозможно.

Ранее уже упоминалось, что градиентное элюирование не рекомендуется применять на адсорбционных колонках либо с рефрактометрическими или кондуктометрическими детекторами. Примеры использования градиентного элюирования можно найти в любом разделе данной книги.

18.3. Переключение колонок¹

Альтернативой градиентному элюированию является способ переключения колонок, в ходе которого неподелившиеся вещества (и, соответственно, их пики) на первой колонке будут разделены на второй или других колонках. Не представляющие интереса части хроматограммы чаще всего отбрасываются, а все остальные: *начало*, *середину* или *конец* — вырезают и подвергают дальнейшему разделению.

Колонки и краны могут находиться в том порядке, который определяет сам хроматографист, желающий прежде всего достичь максимальной селективности. Ниже приведены некоторые возможные сочетания колонок:

- а) адсорбенты с различной площадью удельной поверхности;
- б) обращенная фаза с цепочками разной длины;
- в) ионообменники разной силы;
- г) сочетание катионо- и анионообменников;
- д) сочетание различных видов хроматографии: ионообменной и обращенно-фазовой, эксклюзионной и адсорбционной, аффинной и обращенно-фазовой и т. д.²

Последний вариант, в котором, как правило, участвует более одного элюента, известен как многомерная хроматография — самый многообещающий вариант. Все условия разделения должны быть нацелены на компрессию пиков, чтобы неизбежные внеколоночные объемы свести к минимуму. Таким образом достигается максимально возможная эффективность разделения.

Все необходимое оборудование для организации схем переключения колонок коммерчески доступно, но в равной степени хорошие результаты можно получить и при создании системы своими руками. Для этого пригодятся шести- и десятиходовые краны. Один десятиходовой кран можно заменить двумя шестиходовыми.

При использовании методик с переключением колонок существует риск появления системных пиков (раздел 19.9). Системные пики могут быть не видны на хроматограмме, но они влияют на форму других пиков³.

¹ R.E. Majors *et al.*, *LC GC Mag.*, **14**, 554 (1996); E. Hogendoorn, P. van Zoonen and F. Hernández, *LC GC Eur.*, **16** (12a), 44 (2003).

² Ионообменная и эксклюзионная хроматография белков: M.W. Bushey and J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **62**, 161 (1990).

³ T. Arvidsson, *J. Chromatogr.*, **407**, 49 (1987).

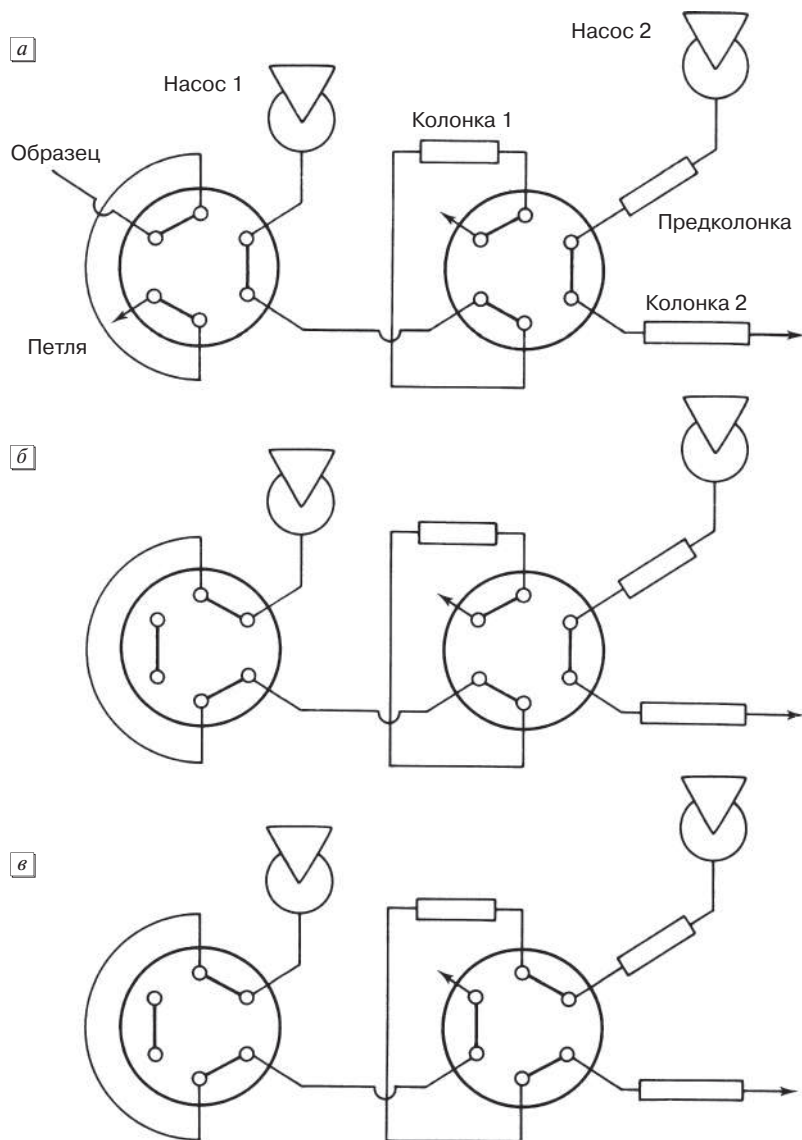


Рис. 18.8. Положение кранов при разделении тобрамицина. Условия: колонка 1 — катионообменник $30 \times 4,6$ мм, 10 мкм, вторая колонка RP-18 $125 \times 4,6$ мм, 5 мкм, преднасыщающая колонка с силикагелем 25×22 мм, 37—54 мкм, подвижная фаза 1—10 мМ фосфата натрия (рН 5,2), скорость потока 1,5 мл/мин, подвижная фаза 2—50 мМ EDTA (рН 8,8), скорость потока 1,5 мл/мин

Пример, из которого виден огромный потенциал методики переключения колонок¹, — определение аминогликозидного антибиотика тобрамицина в сыворотке крови. Пациенты, принимающие этот антибиотик, должны находиться

¹ G.J. Schmidt and W. Slavin, *Chromatogr. Newsl. Perkin-Elmer*, **9**, 21 (1981).

на особом контроле, так как возможна передозировка. На рис. 18.8 показана схема организации методики переключения колонок.

Белки, содержащиеся в 100 мкл сыворотки, осаждают с помощью 100 мкл 0,078 N сульфосалициловой кислоты. Затем центрифугируют, 50 мкм осветленного раствора вводят в петлю хроматографа (этап А). Антибиотик находится в протонированной форме. Поворачивают кран инжектора, и образец потоком кислой подвижной фазы, нагнетаемой насосом 1, перемещается в колонку 1 (этап Б). На этой короткой колонке, упакованной катионообменником, тобрамицин удерживается, а все основные примеси уходят в слив. После чего переключают кран (этап В), и основной элюент из насоса 2 в обратном направлении перемещает антибиотик в колонку 2. (Преднасыщающая колонка, установленная рядом с насосом 2, насыщает элюент силикагелем.) Постколоночная дериватизация о-фталевым альдегидом позволяет обнаружить вещество с помощью флуоресцентного детектора при 340—440 нм.

На рис. 18.9 показано, насколько может быть эффективна двумерная хроматография. Хроматограмма А — «холостое» разделение сыворотки с прямым введением пробы на колонку 2. На хроматограмме присутствует слишком много примесей. Хроматограмма Б — «холостое» разделение сыворотки с помощью переключения колонок 1 и 2. Видно, что на хроматограмме в диапазоне 4—6 мин отсутствуют посторонние примеси. Хроматограмма В — определение тобрамицина в сыворотке пациентов методом переключения колонок.

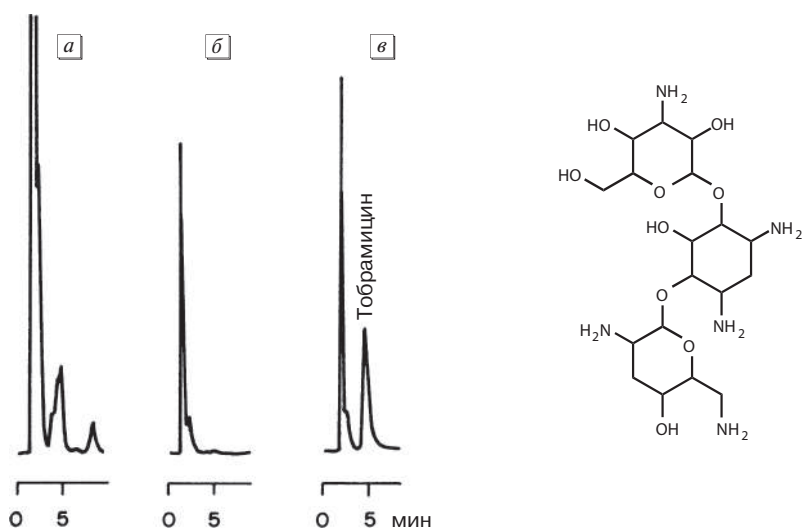


Рис. 18.9. Определение тобрамицина (с разрешения Perkin-Elmer). (а) Сыворотка крови наносится непосредственно на колонку 2, (б) анализ сыворотки крови, сделанный по методике переключения колонок, (в) анализ сыворотки крови человека, принимавшего тобрамицин, сделанный по методике переключения колонок

18.4. Комплексная двумерная ВЭЖХ¹

Комплексная хроматография подразумевает использование нескольких видов хроматографии, метод, который позволяет более подробно исследовать весь элюат. В случае метода переключения колонок (раздел 18.3) только часть элюата переносится на вторую колонку и анализируется на ней. При комплексной ВЭЖХ весь элюат разделяется во втором измерении на другой короткой колонке с отличающейся селективностью. Так можно разделить группу пиков, которые в первом измерении разделились плохо или не разделились совсем. Поэтому заметного успеха можно добиться только тогда, когда две колонки существенно различаются по своим свойствам². Подвижные фазы могут быть одинаковыми, а могут и различаться. Обычно они смешиваемые. В двумерной хроматографии обычно сочетают такие виды хроматографии, как эксклюзионная (гель-фильтрация) и обращенно-фазовая или ионообменная и обращенно-фазовая. Если подойти с умом к выбору фаз, то можно даже использовать два элюента с частичной растворимостью. Например, сначала разделение происходит на нормальной фазе, а потом — на обращенной³. При таком подходе гарантируется максимальное различие в фазах разделения и достигается максимальная полнота разделения.

В первом измерении возможен градиент с длительным временем элюирования. Подвижная фаза с первого разделения накапливается в течение 1—5 мин и подается на вторую колонку. Осуществить это можно с помощью петель соответствующего объема (для хранения фракций в течение цикла), коротких «предколонок» или используя две одинаковые колонки, работающие попеременно во втором измерении⁴. Продолжительность разделения во втором измерении не должна быть больше, чем желаемая скорость регистрации второй серии хроматограмм, т. е. за 1, 2, 5 мин и так до максимума. Второе разделение также можно выполнить в градиентном режиме, хотя оборудование для изократики попроще.

Такие хроматограммы обычно представляют в двумерном виде, в виде оконтуренных пятен или цветных пятен с градуированной интенсивностью. Мы смотрим на них как на карты, т. е. «сверху».

В комплексной двумерной хроматографии существенно увеличивается достигаемая пиковая емкость⁵, появляется шанс разделить очень сложную смесь. На рис. 18.10 показано двумерное разделение антиоксидантов на полярном (полиэтиленгликолиевый силикагель) и неполярном (C₁₈ силикагель) сорбентах.

¹ S. A. Cohen and M. R. Schure, eds., *Multidimensional Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2008; D. R. Stoll et al., *J. Chromatogr. A*, **1168**, 3 (2007); P. Dugo et al., *J. Chromatogr. A*, **1184**, 353 (2008).

² P. Jandera, *J. Sep. Sci.*, **29**, 1763 (2006); P. Jandera, *LC GC Eur.*, **20**, 510 (2007) или *LC GC North Am.*, **26**, 72 (2008).

³ P. Dugo et al., *Anal. Chem.*, **76**, 2525 (2004).

⁴ I. François et al., *J. Chromatogr. A*, **1178**, 33 (2008).

⁵ X. Li, D. R. Stoll and P. W. Carr, *Anal. Chem.*, **81**, 845 (2009).

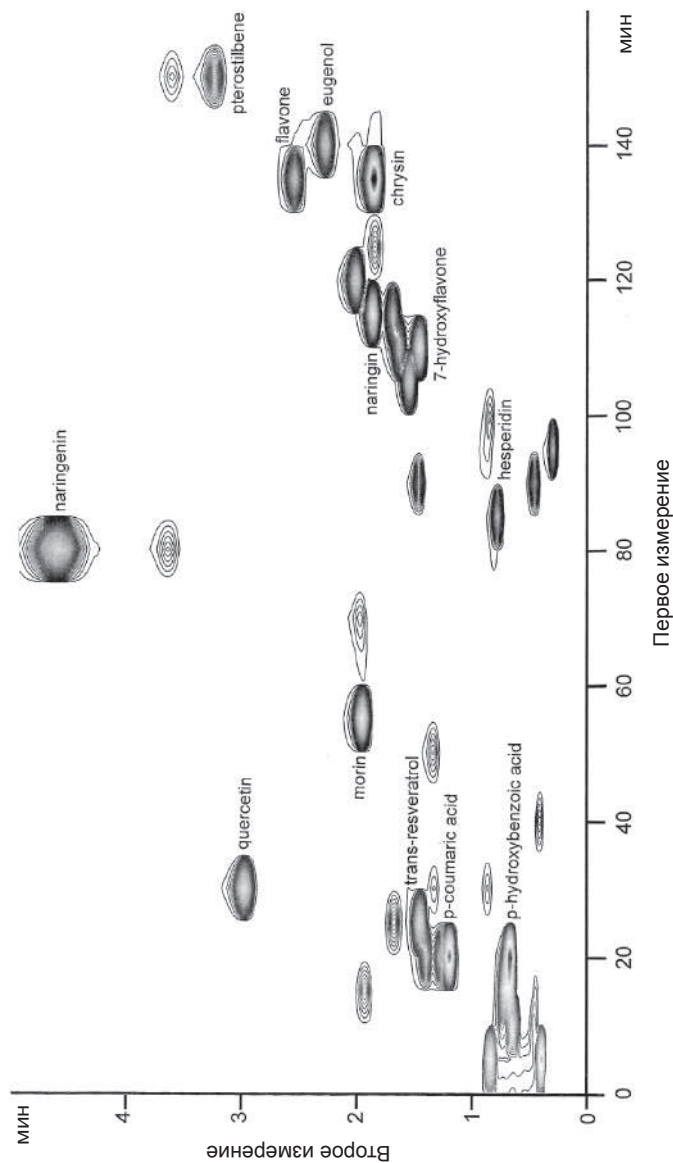


Рис. 18.10.

Двумерное разделение фенольных и флавоновых антиоксидантов [Р. Jandera, University of Pardubice, Czech Republic; см. также: F. Sassiola et al., *J. Chromatogr. A*, **1149**, 73 (2007)]. Условия первого разделения: колонка 15 см \times 4,6 мм, сорбент PEG силикагель, 5 мкм; подвижная фаза вода-ацетонитрил, градиент 1—55 % ацетонитрила за 200 мин, скорость потока 0,3 мл/мин. Десятиходовой кран с двумя колонками, заполненными X-Terra C18, 30 \times 4,6 мм для концентрирования элюата после первого измерения. Продолжительность цикла 5 мин. Условия второго разделения: колонка 100 \times 4,6 мм, сорбент SpeedROD RP-18e (моноклассический), подвижная фаза вода-ацетонитрил, градиент 1—40 % ацетонитрила за 5 мин, ДМД 254 + 260 + 280 + 320 нм. Из огромного количества идентифицированных веществ на рисунке указаны только самые важные

18.5. Оптимизация изократического разделения с помощью четырех растворителей

Многие проблемы разделения можно решить без градиента, оптимизировав подвижную фазу. Все градиенты требуют уравнивания, которое занимает определенное время. В этом и состоит недостаток метода.

В разделах 9.4 и 10.3 уже упоминалось, что при оптимизации следует использовать три разные смеси растворителей: гексан — эфир, гексан — хлористый метилен и гексан — этилацетат в адсорбционной хроматографии и вода — метанол, вода — ацетонитрил и вода — тетрагидрофуран в обращенно-фазовой хроматографии. Однако эта схема не ограничивается только лишь бинарными смесями. В целях улучшения разделения в подвижную фазу может быть добавлен третий и даже четвертый компонент. Комбинация из семи разных смесей (рис. 18.11) дает лучшую основу для точного определения состава подвижной фазы¹. Примеры приведены ниже.

Вода — метанол (60:40) — состав наиболее подходящей подвижной фазы (относительно времен удерживания) для разделения десяти фенолов методом ОФ-ЖХ (эксперимент 1 на рис. 18.12). Полярность подвижной фазы рассчитывают следующим образом²:

$$P'_{\text{смеси}} = P'_1\varphi_1 + P'_2\varphi_2 = (0 \cdot 0,6) + (2,6 \cdot 0,4) = 1,04.$$

Для всех семи хроматограмм P' остается постоянной.

Эксперимент 2 с ацетонитрилом:

$$\varphi_{\text{ACN}} = \frac{P'_{\text{смеси}}}{P'_{\text{ACN}}} = \frac{1,04}{3,2} = 0,33.$$

Состав подвижной фазы вода — ацетонитрил: 67:33.



Рис. 18.11. Положение семи смесей в треугольнике селективности

¹ J. L. Glajch, J. J. Kirkland and J. M. Minor, *J. Chromatogr.*, **199**, 57 (1980).

² Сравните с разделом 10.3. Величина P' имеет другое значение, а именно: $P'_{\text{MeOH}} = 2,6$, $P'_{\text{ACN}} = 3,2$, $P'_{\text{THF}} = 4,5$.

Эксперимент 3 с тетрагидрофураном:

$$\varphi_{\text{ТГФ}} = \frac{1,04}{4,5} = 0,23.$$

Состав подвижной фазы вода — ТГФ: 77:23.

Эксперимент 4 с метанолом и ацетонитрилом. Подвижная фаза состоит из смеси элюентов, используемых в экспериментах 1 и 2: в соотношении 1:1.

Вода: $(0,5 \cdot 60) + (0,5 \cdot 67) = 63,5$ частей.

Метанол: $0,5 \cdot 40 = 20$ частей.

Ацетонитрил: $0,5 \cdot 33 = 16,5$ частей.

[Проверка: $P' = (0,635 \cdot 0) + (0,2 \cdot 2,6) + (0,165 \cdot 3,2) = 1,05$]

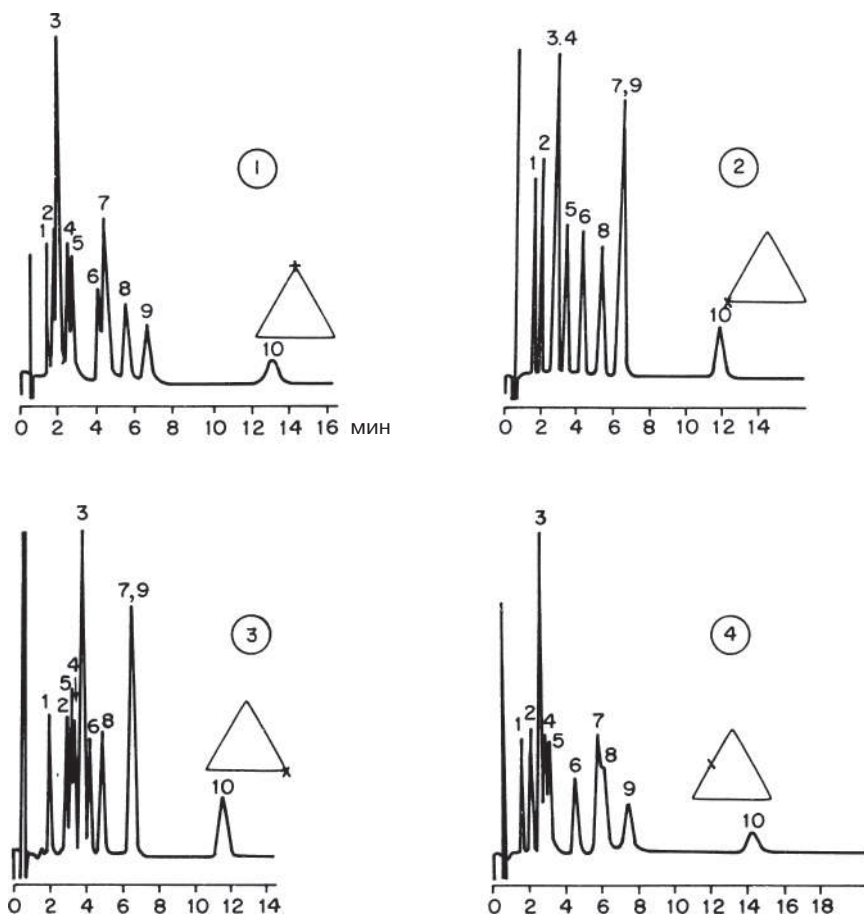


Рис. 18.12. Последовательная оптимизация разделения десяти фенолов (печатается с разрешения Du Pont). Пики: 1 — фенол, 2 — *n*-нитрофенол, 3 — 2,4-динитрофенол, 4 — *o*-хлорфенол, 5 — *o*-нитрофенол, 6 — 2,4-диметилфенол, 7 — 4,6-динитро-*o*-крезол, 8 — *n*-хлор-*m*-крезол, 9 — 2,4-дихлорфенол, 10 — 2,4,6-трихлорфенол

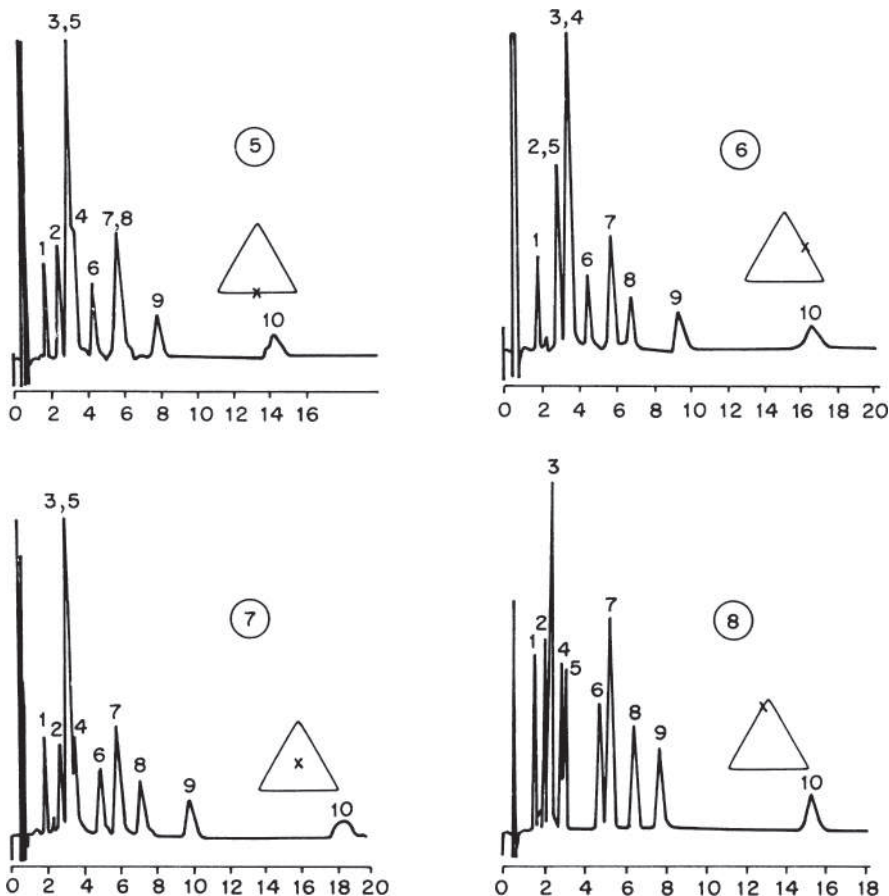


Рис. 18.12. (окончание)

Эксперимент 5 с ацетонитрилом и ТГФ. Смесь элюентов из экспериментов 2 и 3 в соотношении 1:1 состоит из воды, ацетонитрила, ТГФ (72:16,5:11,5).

Эксперимент 6 с метанолом и ТГФ. Смесь элюентов из экспериментов 1 и 3 в соотношении 1:1 состоит из воды, метанола, ТГФ (68,5:20:11,5).

Эксперимент 7 с метанолом, ацетонитрилом и ТГФ. Подвижная фаза состоит из смеси элюентов из экспериментов 1–3 в соотношении 1:1:1.

Вода: $(0,33 \cdot 60) + (0,33 \cdot 67) + (0,33 \cdot 77) = 68$ частей.

Метанол: $0,33 \cdot 40 = 13$ частей.

Ацетонитрил: $0,33 \cdot 33 = 11$ частей.

ТГФ: $0,33 \cdot 23 = 8$ частей.

Один из этих вариантов, возможно, будет близок к оптимальному, т.е. разрешение соседних пиков составит по крайней мере 1. Если ни один из этих экспериментов не дает необходимого разделения, то, как минимум будет более или менее понятно, какие растворители дают лучшие результаты, и в дальнейшем, варьируя их соотношение, можно будет подобрать подходящий элюент.



Если хроматографическая система не способна работать с четырьмя различными элюентами одновременно и не снабжена специальной компьютерной программой для контроля за процессом, то на практике такой вид оптимизации проводить очень утомительно. Компьютер необходим для расчета и контроля за семью смесями элюентов.

На рис. 18.12 изображены хроматограммы экспериментов с семью разными подвижными фазами. Фенолы необходимо разделять в слабокислой среде (уксусная кислота), которая также вносит свой вклад в селективность. Поэтому компьютерные вычисления состава подвижной фазы, приведенные выше, немного отличаются от использованных при разделении. Последний 8 эксперимент — это оптимальное разделение, которое было получено по результатам семи предыдущих и для которого требуется четыре компонента (63 % воды с 1 % уксусной кислоты — 34 % метанола — 3 % ацетонитрила).

18.6. Оптимизация других параметров

Оптимизацию подвижной фазы проводят в рабочем порядке способом, описанным выше. Полнота этого метода бросается в глаза: компоненты подвижной фазы выбраны не случайным образом, а в соответствии с их положением в треугольнике селективности, сумма всех компонентов всегда равна 100 %.

Есть и другие параметры, выбор которых не столь очевиден: сорбент, температура, pH^1 (или другие ионные эффекты), вторичные химические равновесия, такие как образование ионных пар. Оптимизировать в данном случае гораздо сложнее. Поскольку процессы, участвующие в разделении, открытые, то и условия подбирают методом случайного выбора. Тем не менее, как показано в примере², последовательное изменение некоторых, наиболее влияющих на разделение параметров может оказаться весьма результативным.

Смесь из шести соединений с разными кислотно-основными свойствами разделяли на обращенной C_{18} фазе в изократическом режиме. Количество метанола (%B) и pH подвижной фазы являются важными параметрами, которые влияют на разделение и требуют оптимизации. Для последовательной оптимизации необходимо несколько экспериментов в пределах 45—65 % B и pH 3,0—6,0. Результаты, т. е. минимальное разрешение критической пары пиков, которое зависит от этих параметров, вычислили математически и представили в виде поверхности в трехмерном пространстве (как на рис. 18.16). Математически было предсказано, что все соединения в образце разделятся с приемлемым разрешением при 50 % B и pH 3,0 или 4,0. На практике так и оказалось. Хроматограмма разделения приведена на рис. 18.13.

Оптимизация может быть последовательной, как показано на описанном выше примере, или направленной. Оба эти процесса могут быть автоматизиро-

¹ P.J. Schoenmakers, S. van Molle, C. M. G. Hayes and L. G. M. Uunk, *Anal. Chim. Acta*, **250**, 1 (1991).

² Y. Hu and D. L. Massart, *J. Chromatogr.*, **485**, 311 (1989).

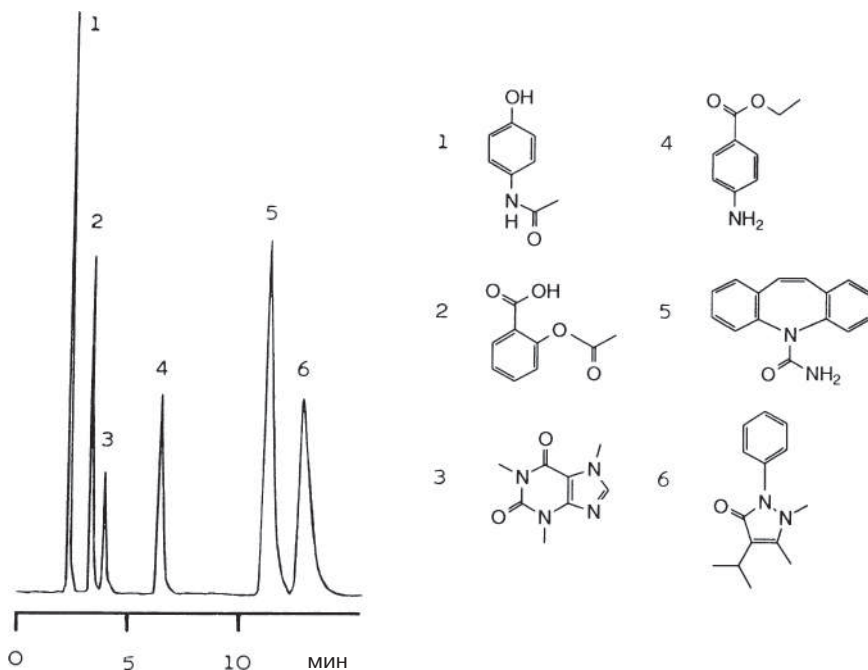


Рис. 18.13. Хроматограмма разделения шестикомпонентной смеси кислот и оснований в оптимизированных условиях [печатается с разрешения из Y. Hu and D. L. Massart, *J. Chromatogr.*, **485**, 311 (1989)]. Условия: колонка 250×4 мм, сорбент LiChrosorb RP18 5 мкм, подвижная фаза метанол-фосфатный буфер pH 3,0 (1:1), скорость потока 1 мл/мин, ДМД. Пики: 1 — парацетамол, 2 — ацетилсалициловая кислота, 3 — кофеин, 4 — бензокаин, 5 — карбamazепин, 6 — пропиленфазон

рованы¹. *Последовательная оптимизация* подразумевает изменение интересующих параметров по хорошо разработанной схеме внутри определенных границ. Граничные условия и ширину шага подбирает сам хроматографист, руководствуясь предыдущим опытом. Статистика может помочь в оптимизации. Используя ее, хроматографист сокращает количество экспериментов. При *направленной оптимизации* специалист после каждого эксперимента решает, в правильном направлении идет процесс оптимизации или нет, после чего либо продолжает двигаться в этом направлении, либо кардинально его меняет. Симплекс-метод — это самый известный пример такого рода процесса².

Для проведения автоматической оптимизации требуется эффективная компьютерная программа, с помощью которой можно было бы оценить, ка-

¹ S. N. Deming and S. L. Morgan, *Experimental Design: A Chemometric Approach*, Elsevier, Amsterdam, 1991; B. Dejaegher and Y. Vander Heyden, *LC GC Eur.*, **20**, 526 (2007); S. L. C. Ferreira et al., *J. Chromatogr. A*, **1177**, 1 (2008); P. F. Vanbel and P. J. Schoenmakers, *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 1283 (2009).

² J. C. Berridge, *J. Chromatogr.*, **485**, 3 (1989).

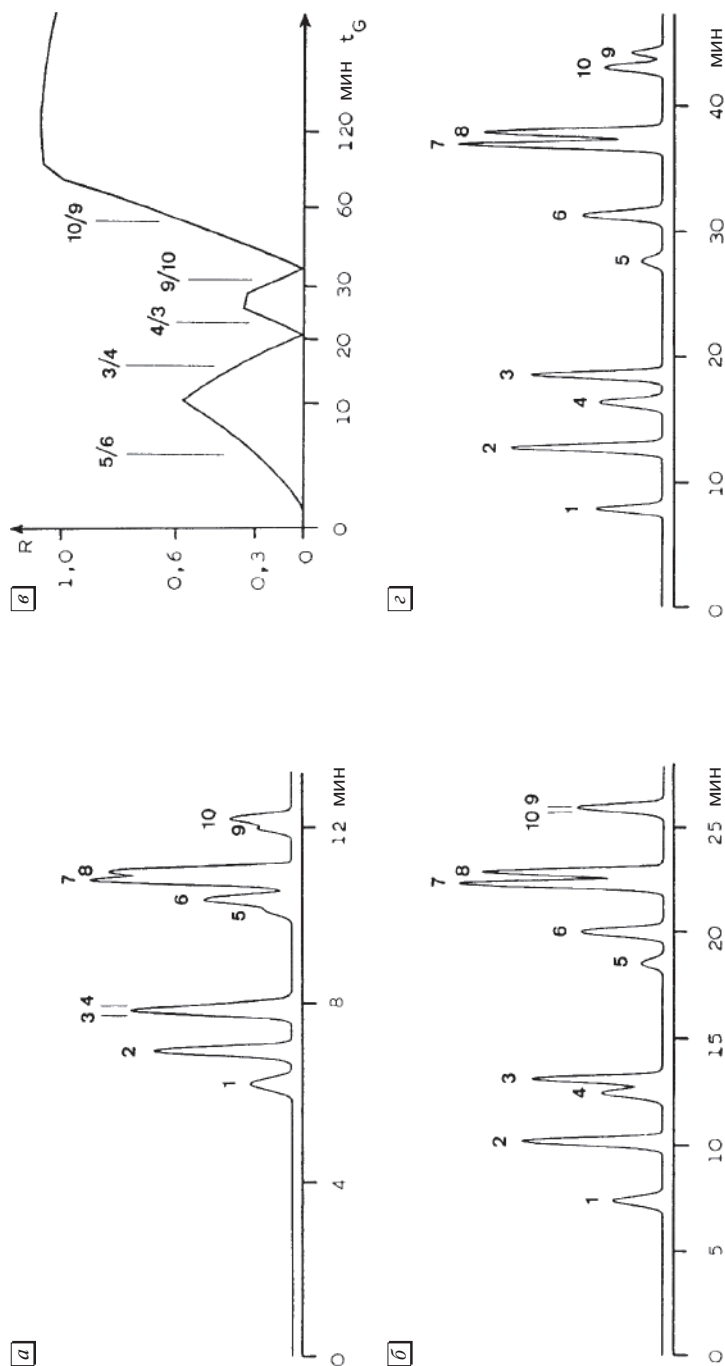


Рис. 18.14. Диаграммы. Разделения проводили в условиях линейного градиента от 0 до 45 % В. Требуется определить оптимальную продолжительность градиента. (а) Градиент за 15 мин; (б) градиент за 45 мин с небольшими изменениями в порядке элюирования пиков; (в) диаграмма, полученная по результатам первых двух экспериментов с предположением о линейной зависимости времени удерживания от %В; график показывает зависимость разрешения критической пары пиков R от времени градиента и выявляет, что для хорошего разрешения нужны большие продолжительности градиента; (г) хроматограмма с оптимизированными условиями 0—45 % В за 80 мин. Разделение при этом заканчивается уже на 45 мин при 25 % В

кое из разделений лучше. Так называемая функция разрешения, для которой было придумано множество разных определений, используется как объективный критерий оценки зависимости разрешения соседних пиков от времени анализа. К важным преимуществам использования компьютерных программ можно отнести идентификацию отдельных пиков благодаря либо анализу стандартных образцов, либо спектральным методам. Симплекс-метод можно использовать для автоматической оптимизации разделения сложных кислотно-основных смесей посредством одновременного изменения pH, концентрации ион-парного реагента, состава трехкомпонентной подвижной фазы, скорости потока и температуры. Некоторые программы автоматической оптимизации коммерчески доступны. Без сомнения, эти программы хорошо решают множество различных проблем, и все же они далеки от совершенства.

Экономить время, растворители и химические реагенты позволяет компьютерное моделирование разделения в различных условиях¹. Для компьютерного моделирования требуется провести два разделения с разным составом подвижной фазы и результаты (значения k) занести в компьютер. Некоторое количество такого рода программ коммерчески доступны. Обычно результаты компьютерного моделирования представляют в виде *диаграмм*. На рис. 18.14 представлены такие диаграммы, на которых изображена зависимость разрешения критической пары пиков от продолжительности градиента. Кроме того, на диаграмме можно представить и другие параметры, влияющие на процесс. Такие диаграммы позволяют сразу подобрать оптимальные условия.

Одновременная оптимизация продолжительности градиента и температуры

На рис. 18.15 приведен пример выполненной на компьютере оптимизации продолжительности линейного градиента и температуры. Для начала необходимо было выполнить четыре эксперимента: два при разной температуре (50 и 60 °C) и два с разным временем градиента (17 и 51 мин). По этим данным компьютерная программа сразу же определяет оптимальные условия: 57 °C и 80 мин. Моделированная программой хроматограмма показана на рис. 18.15 (вверху). Видно, что не все пики хорошо разрешены. Некоторые из них имеют R не больше 0,7. Поскольку не все пики представляют одинаковый интерес, было решено не разделять пики 8, 9, 12, 13, 15 и 16. После упрощения задачи программа предложила следующие условия: 55 °C и 54 мин (средняя хроматограмма). Реальная хроматограмма (нижняя) практически полностью совпадает с моделированной программой.

Кроме качества разделения (разделения критической пары пиков), необходимо рассмотреть *устойчивость* метода (также обратите внимание на раздел 20.3). Не рекомендуется работать с методом, малейшие флуктуация параметров которого (например, изменение pH) будут сильно влиять на качество разделения. Для повседневных разделений гораздо лучше использовать устойчивый метод,

¹ I. Molnar, *J. Chromatogr. A*, **965**, 175 (2002).

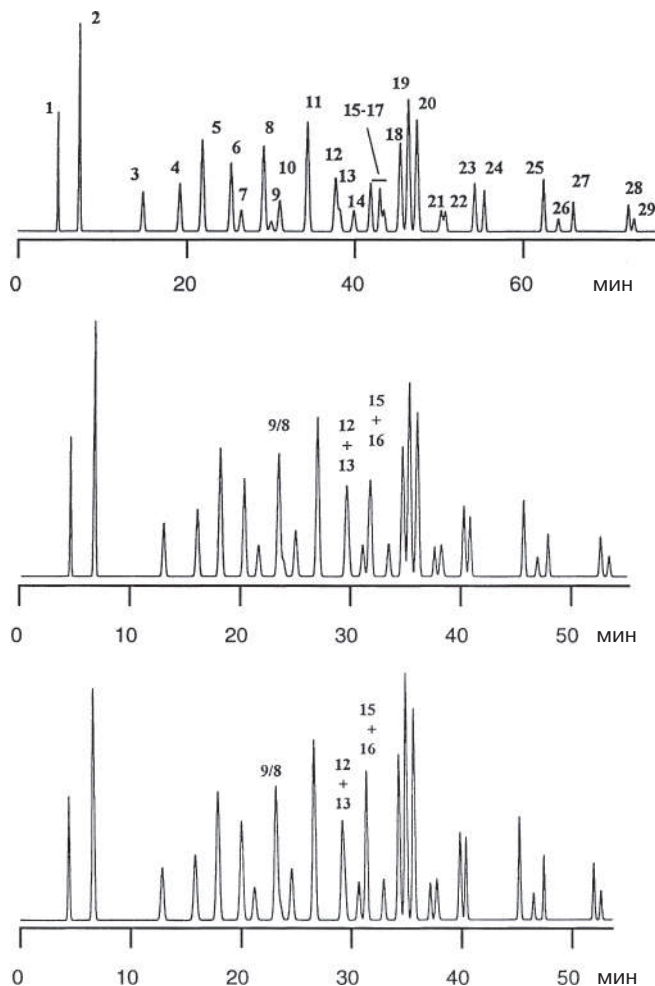


Рис. 18.15. Оптимизация продолжительности градиента и температуры [J. W. Dolan et al., *J. Chromatogr. A*, **803**, 1 (1998)]. Условия: образец — водорослевые пигменты, колонка $250 \times 3,2$ мм, сорбент Vydac 210TP C_{18} , 5 мкм, градиент от 70 до 100 % метанола в 28 мМ тетрабутиламмоний ацетатном буфере с pH 7,1, скорость потока 0,65 мл/мин. Верхняя хроматограмма — компьютерная модель разделения при 57 °С и времени градиента 80 мин; средняя хроматограмма — компьютерная модель разделения с тремя парами сдвоенных пиков при 55 °С и 54 мин; нижняя хроматограмма — экспериментальная хроматограмма в этих же условиях

даже если с его помощью не удастся достичь максимального разрешения. Гипотетический пример приведен на рис. 18.16. В точке В разрешение хуже, но метод гораздо устойчивее, чем в точке А.

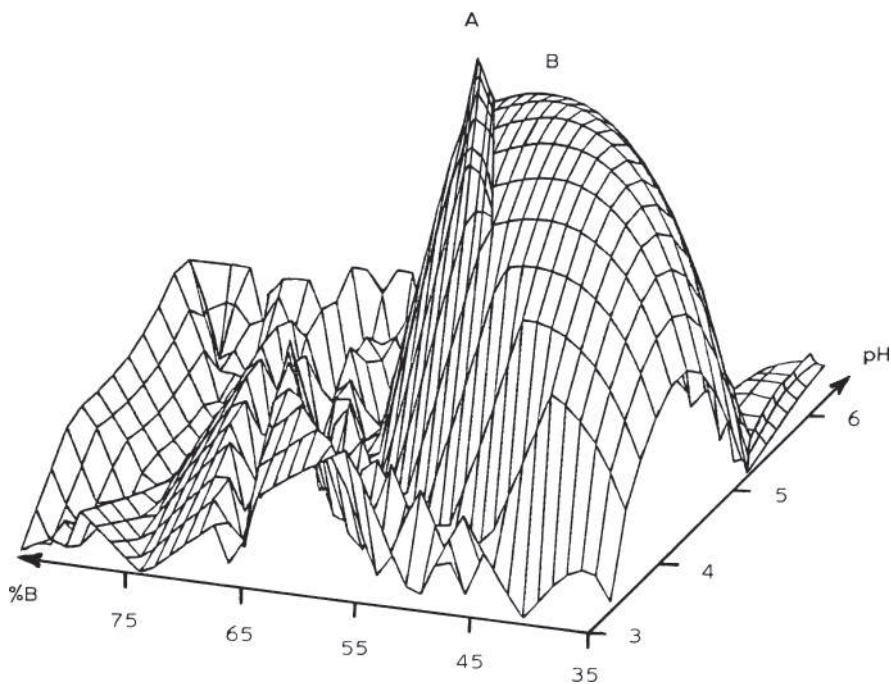


Рис. 18.16. Устойчивость метода. Здесь критерий качества, т. е. разрешение, изображено поверхностью, каждая точка на которой показывает разрешение в зависимости от условий (доля растворителя В (%) и pH). Значения параметров в точке А соответствуют максимально качественному разделению, но при этом высока вероятность флуктуации метода, особенно это касается увеличения % В и понижения pH. Метод, использующий параметры в точке В, более устойчив, но с небольшим проигрышем в качестве разделения

18.7. Смешанные сорбенты

Сорбенты также играют важную роль в оптимизации разделения. Несмотря на неизбежные затраты, следует протестировать различные сорбенты. Может быть, даже лучше одновременно использовать два разных сорбента. Для этого используют соединение нескольких колонок — две или более колонки с разными сорбентами, расположенные последовательно (без переключения колонок)¹. Удобным способом является использование смешанных сорбентов, т. е. колонку упаковывают смесью двух или более разных сорбентов, предварительно определив перспективные типы сорбентов и их соотношения. На рис. 18.17 изображено разделение кислых (например, β -лактоглобулин А с изоэлектрической точкой pH 5,1) и основных (например, лизоцим с pH 11,0) белков. Использование колонок на основе смешанных сорбентов позволяет разделить смесь этих белков за один анализ, чего нельзя сделать на обычном катионообменнике или анионообменнике.

¹ S. Hyredi, Z. Szűcs and L. Szepes, *Chromatographia Suppl.*, **63**, S-3 (2006); S. Louw et al., *J. Chromatogr. A*, **1208**, 90 (2008).

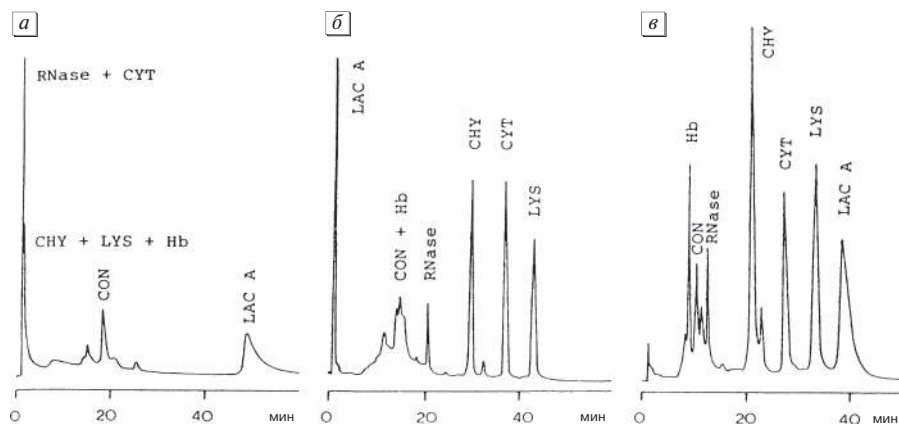


Рис. 18.17. Разделение белков на смешанном сорбенте [печатается с разрешения Elsevier Science Publishers BV из Z. el Rassi and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, **359**, 255 (1986)]. Сорбенты: А — сильный анионообменник (Zorbax SAX-300); Б — сильный катионообменник (Zorbax SCX-300); В — смесь сорбентов А и Б (1:1), размер частиц 7 мкм, колонка 80×6,2 мм (А и Б), 100×4,6 мм (В). Подвижная фаза: 20 мМ *трис*-HCl (pH 7,0), градиент от 0 до 0,3 М NaCl за 40 мин, скорость потока 1,5 мл/мин (А и Б), 1,0 мл/мин (В), УФ-детектор, 280 нм. RNase — рибонуклеаза, CYT — цитохром с, CHY — α -химотрипсиноген А, LYS — лизоцим, Hb — гемоглобин, CON — кональбумин, LAC A — β -лактоглобулин А

19.1. Качественный анализ¹

Целью качественного анализа является идентификация пиков на хроматограмме или определенного компонента в элюате. В случае, если химическая природа пика совершенно неизвестна, можно использовать специальное оборудование, описанное в разделе 6.10, для идентификации пиков различными аналитическими методами. Для этих целей с помощью препаративной или полупрепаративной ВЭЖХ (глава 21) необходимо выделить достаточное количество вещества.

Если предполагается наличие одного или нескольких известных компонентов в образце смеси, то наиболее простым средством подтверждения является сравнение значений k эталонного вещества и вещества в пробе при одинаковых хроматографических условиях. Если образец сравнения имеет такое же время удержания, как у пика на хроматограмме пробы, то эти два вещества могут быть одинаковыми. Однако необходимо сделать еще несколько тестов для того, чтобы утверждать это с высокой степенью достоверности.

а) Вещество сравнения смешивают с частью образца и смесь вводят в хроматографическую колонку (совместная инъекция). Предполагаемый пик должен стать выше, без каких-либо плеч или уширения. Чем большее число теоретических тарелок содержит колонка, тем выше шанс разделить, по крайней мере частично, два различных компонента с аналогичным хроматографическим поведением.

б) Тот же тест следует провести с другой подвижной фазой и желательно на другой стационарной фазе (с подходящим элюентом). Предпочтительными являются пары фаз, которые имеют разный механизм удерживания, т.е. нормальная и обращенная фазы. Если же компонент смеси с образцом сравнения никак не хочет разделяться, то с большой вероятностью можно утверждать, что эти вещества идентичны.

Для того чтобы быть абсолютно уверенным в идентичности, предполагаемый пик необходимо проанализировать. Однако качественный анализ может быть в некоторых случаях улучшен:

а) чем выше специфичность детектора, тем больше вероятность того, что детектор идентифицирует искомый пик. Рефрактометрический детектор может обнаружить все компоненты, но УФ-детектор покажет только соединения,

¹ M. Valcárcel et al., J. Chromatogr. A, **1158**, 234 (2007).



поглощающие УФ-излучение, а флуоресцентный детектор — только флуоресцирующие вещества. Высокая специфичность (для флуоресцирующих веществ) может быть еще больше увеличена с помощью выбора длины волны возбуждения и флуоресценции;

б) изменение длины волны УФ-детектора должно сопровождаться одинаковым изменением сигнала от вещества в образце и вещества сравнения, т.е. степень увеличения или уменьшения должна быть одинакова. Отношение абсорбций для двух случайных длин волн одного соединения является характеристическим¹;

в) величина отношения УФ-сигнала и рефрактометрического детектора (или любой другой пары детекторов, которые могут быть использованы) является характеристической для каждого вещества при заданных условиях.

Гораздо более доказательными, но и более требовательными являются специальные методы, упомянутые в разделе 6.10. В частности, инструментом для качественного анализа являются диодно-матричный детектор и масс-спектрометр.

Не надо путать пики от растворителя образца, связанные с изменением показателя преломления, и пики растворенного вещества (рис. 19.1). Образец лучше растворять в подвижной фазе, чтобы вас не вводили в заблуждение эти пики-призраки. Однако, если растворение пробы в подвижной фазе невозможно, можно провести слепой тест с используемым растворителем.

Времена удерживания довольно сильно зависят от стабильности работы насосов, и ввод смеси образца и вещества сравнения является более точным тестом.

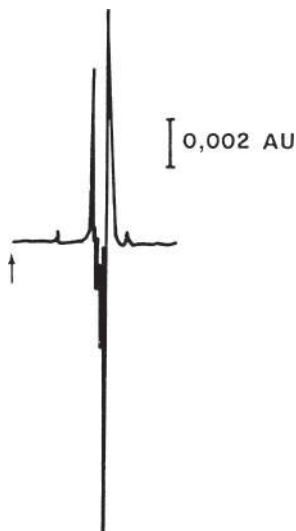


Рис. 19.1. Пики, связанные с изменением показателя преломления. Ввод 10 мкл смеси метанол-вода (1:1) (используется в качестве растворителя образца); подвижная фаза диоксан-вода (10:90); УФ, 254 нм

¹ A. C. J. H. Drouen, H. A. H. Billiet and L. De Galan, *Anal. Chem.*, **56**, 971 (1984).

19.2. Анализ следовых количеств вещества

Если аналитическая задача состоит в качественном или количественном определении аналита с низким содержанием в пробе, то в первую очередь необходимо оптимизировать хроматографическую систему. При изократическом режиме элюирования концентрация вещества в максимуме пика c_{\max} ниже, чем во вводимом растворе c_i^1 :

$$c_{\max} = \frac{c_i V_i}{V_R} \sqrt{\frac{N}{2\pi}},$$

где V_i — вводимый объем образца, V_R — объем удерживания, $V_R = t_R F$, N — число теоретических тарелок колонки. (При градиентном элюировании c_{\max} больше значения, рассчитанного по этой формуле.)

Задача 34

10 мкл раствора с концентрацией 1 мд (10^{-6} г·мл⁻¹) исследуемого вещества вводят в хроматографическую систему. Объем удерживания пика при этом 14 мл. Для этого пика рассчитанное число теоретических тарелок составляет 10 000. Чему равна концентрация вещества в максимуме пика?

Решение

$$c_{\max} = \frac{1 \cdot 10}{14 \cdot 10^3} \sqrt{\frac{10\,000}{2\pi}} \text{ мд} = 0,028 \text{ мд.}$$

Для анализа микропримесей необходимо получить как можно более высокий сигнал, т. е. наибольшую концентрацию c_{\max} . Как это можно сделать?

Задача 35

Для решения задачи 34 была использована колонка 150×4,6 мм, упакованная сорбентом с диаметром частиц 5 мкм. Максимальная концентрация 0,028 мд дала сигнал 1 мВ на УФ-детекторе. Рассчитать интенсивность сигнала при условии, что:

- а) длина колонки 25 см;
- б) внутренний диаметр колонки 3 мм;
- в) диаметр частиц сорбента 3,5 мкм.

Все остальные параметры остаются неизменными.

Решение

а) Если сорбент в новой колонке упакован так же, как и в предыдущей, то и высота H теоретической тарелки будет такой же, как у предыдущей колонки. Поэтому число теоретических тарелок колонки длиной 25 см и удерживаемый объем будут в 1,7 раза больше ($25 : 15 = 1,7$).

¹ B. L. Karger, M. Martin and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, **46**, 1640 (1974).



$$c_{\max} = \frac{1 \cdot 10}{1,7 \cdot 14 \cdot 10^3} \sqrt{\frac{1,7 \cdot 10\,000}{2\pi}} \text{ мд} = 0,022 \text{ мд},$$

что соответствует сигналу 0,8 мВ.

$$\text{б) } V_R = \frac{14 \cdot 3^2}{4,6^2} \text{ мл} = 6,0 \text{ мл}$$

$$c_{\max} = \frac{1 \cdot 10}{6 \cdot 10^3} \sqrt{\frac{10\,000}{2\pi}} \text{ мд} = 0,066 \text{ мд},$$

что соответствует сигналу 2,4 мВ.

в) Одинаковое качество упаковки колонки частицами диаметром 3,5 мкм даст нам количество тарелок в 1,4 раза больше ($5,0:3,5 = 1,4$), чем у исходной колонки.

$$c_{\max} = \frac{1 \cdot 10}{14 \cdot 10^3} \sqrt{\frac{1,4 \cdot 10\,000}{2\pi}} \text{ мд} = 0,034 \text{ мд},$$

что соответствует сигналу 1,2 мВ.

Отсюда следует, что наименьшее размывание или наибольшая высота пика получаются, если использовать короткую и, главное, с малым внутренним диаметром колонку, с как можно большим числом теоретических тарелок. Залог эффективности разделения колонки кроется в ее малом внутреннем диаметре, высококачественной упаковке, а не в ее длине.

Длинная колонка дает уменьшение максимальной концентрации, так как объем удерживания V_R , а также число теоретических тарелок N пропорциональны длине колонки L_c ; поэтому c_{\max} имеет зависимость $1/\sqrt{L_c}$. Для данного образца с концентрацией c_i разбавление пика менее выражено при большем объеме ввода пробы, большем количестве теоретических тарелок и меньшем объеме удерживания.

Так как $V_R = L_c d_c^2 \pi \epsilon (k+1)/4$ и $N = L_c/H$, то выражение для c_{\max} можно записать как:

$$c_{\max} = 0,5 \frac{c_i V_i}{d_c^2 \epsilon (k+1) \sqrt{L_c H}},$$

где d_c — внутренний диаметр колонки, ϵ — общая пористость, k — коэффициент удерживания, L_c — длина колонки, H — высота теоретической тарелки.

Теперь очевидно, что для увеличения интенсивности сигнала лучше всего:

- использовать колонку с малым внутренним диаметром. Двукратное сокращение внутреннего диаметра дает четырехкратное увеличение c_{\max} ;
- использовать короткую колонку;
- использовать колонку с малой высотой теоретической тарелки. Это достигается выбором сорбента с малым диаметром частиц, отличной упаковкой и хорошими свойствами массообмена на неподвижной фазе. Колонка должна работать при оптимальных скоростях потока, задаваемых уравнением Ван-Деемтера;
- элюировать аналит при малом коэффициенте удерживания.

Хотя короткая колонка предпочтительнее, но выполняемое ею разделение должно быть достаточно хорошим, чтобы решить данную задачу разделения. Метод должен быть оптимизирован для анализа следовых количеств вещества.

Уравнения показывают, что масса вводимого образца (т. е. произведение $c_i V_i$) должна быть большой. Колонку можно перегружать по отношению к основным компонентам образца до тех пор, пока это не оказывает воздействия на разделение пиков микропримесей (рис. 19.2). Однако объем вводимой пробы должен быть ограничен, чтобы не допустить уширения пика. Максимально допустимый объем вводимой пробы, который удерживает уширение пика в пределах 9 %, рассчитывается по формуле^{1,2}:

$$V_i = 0,6 t_R F / \sqrt{N}.$$

Поскольку время удерживания $t_R = t_0(k+1)$, а расход $F = L_c d_c^2 \pi \epsilon / 4 t_0$, то выражение для максимально допустимого объема пробы можно переписать:

$$V_{i \max} = 0,48 \frac{(k+1) L_c d_c^2 \epsilon}{\sqrt{N}}.$$

Если образец имеется в достаточном количестве (например, при анализе пищевых продуктов), то на колонку можно наносить объем образца $V_{i \max}$, даже если рано вышедшие пики будут уширены или колонка будет перегружена по основному компоненту (до тех пор, пока это не влияет на разделение пиков веществ с низким содержанием в образце).

Затем, объединив уравнения для c_{\max} и $V_{i \max}$, мы получим уравнения для максимальной концентрации пика при максимальном объеме инъекции:

$$c_{\max} = 0,24 c_i.$$

При изократическом элюировании это наиболее благоприятный случай (при 9 % уширения пика). Даже в этом случае четырехкратное разбавление анализируемого вещества исключительно велико.

Обратите внимание, что при этих обстоятельствах (доступно достаточное количество образца и вводят максимальный объем $V_{i \max}$) все вышеуказанные требования к колонке, такие как малые диаметр и длина колонки, низкая высота



Рис. 19.2. Перегрузка колонки при анализе микропримесей

¹ М. Martin, С. Eon and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, **108**, 229 (1975).

² Для изократического разделения. — Прим. пер.



тарелки и малое время удерживания, перестают быть важными. Если разрешение не изменяется при $V_{i\max}$, уравнение $c_{\max} = 0,24c_i$ также правильно для колонок большого диаметра, длинных и плохо упакованных колонок. Тем не менее это хорошая рекомендация для оптимизации системы разделения, поскольку затраты с учетом времени и растворителя будут ниже.

Кроме того, для анализа микропримесей должны быть приняты во внимание и некоторые другие параметры:

а) избегать уширения заднего фронта пика. Асимметричный пик шире, следовательно, имеет меньшую высоту, чем симметричный пик;

б) при градиентном элюировании пики сжимаются, поэтому они выше. Градиентное элюирование рекомендуется, если нет возможности элюировать микропримесь с малым коэффициентом удерживания. Переход к ступенчатому градиентному элюированию в нужный момент может быть простым и эффективным решением;

в) детектор должен иметь минимально возможный предел обнаружения. Обычные детекторы, рассчитанные на анализ больших количеств веществ, такие, например, как рефрактометрический детектор, непригодны для анализа микропримесей. Наиболее полезными в этом случае являются флуоресцентные и электрохимические детекторы. Можно скрыть мешающие примеси, выбрав подходящую длину волны при УФ-детектировании (см. рис. 6.7); то же самое возможно и в случае МС при детектировании выбранных ионов. Дериватизация (см. раздел 19.8) может увеличить предел обнаружения на несколько порядков. Количественное определение через высоту пика может быть более точным, чем через площадь пика.

Если выполнение количественного анализа необходимо проводить при соотношении сигнал/шум (C/I) 10 и более (раздел 6.1), то для качественной оценки отношение $C/I = 3$ вполне достаточно.

Для анализа микропримесей пробоподготовка (если это возможно, то в сочетании с обогащением аналита) имеет первостепенное значение. ВЭЖХ сама по себе может обеспечить высокоэффективный метод концентрирования. Вещества сосредотачиваются в начале колонки, если элюирующая сила растворителя слишком мала¹. Если для элюирования используется подвижная фаза с высокой элюирующей силой, то уширение пика мало и концентрация вещества в элюате высока. Эта последовательность действий является наиболее эффективной, если элюирование может быть проведено с коэффициентом удерживания $k = 0$, т. е. вещество выходит с фронтом растворителя. Это называется *вытеснительная хроматография*. Например, можно обогатить хлорфенолы в воде в 4000 раз на стиролдивинилбензольной стационарной фазе². Для разделения основных компонентов и выделения микропримесей может быть очень эффективно использован *метод переключения колонок* (раздел 18.3).

Предел количественного анализа и предел обнаружения смотрите в следующем разделе.

¹ M. Hutta et al., *J. Sep. Sci.*, **29**, 1977 (2006): триазины в почве, объем пробы 20 мл.

² F.A. Maris, J.A. Stab, G.J. De Jong and U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr.*, **445**, 129 (1988).

19.3. Количественный анализ¹

В жидкостной хроматографии сигнал детектора в большей степени зависит от конкретных свойств соединения, чем в газовой хроматографии. Например, УФ-сигнал — это функция молярного коэффициента поглощения, который в зависимости от соединения варьирует между 0 и $10\,000\text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Для гомологов молярный коэффициент поглощения и максимум поглощения также различны. Следовательно, должна быть получена по крайней мере одна калибровочная хроматограмма для каждого количественного анализа².

Калибровка может быть выполнена тремя различными методами: методом внешнего стандарта, внутреннего стандарта и стандартной добавки (см. рис. 19.3). Процедуры, описанные здесь, сделаны для одноточечной калибровки, хотя намного лучше создать калибровочный график, как минимум, по трем точкам, и для расчетов тогда используют угол наклона калибровочного графика, а расчеты, приведенные ниже, не выполняются. Калибровочные графики должны быть прямыми и проходить через начало координат. Для каждой серии количественных анализов необходимо делать новую калибровку. Вполне возможно, что хроматографические условия немного изменились, поэтому использование старых данных может повлечь за собой систематические отклонения. Так как количественный анализ может проводиться как по площади пика, так и по его высоте, термин «сигнал» означает оба варианта (см. раздел 19.5).

В качестве примера приведем задачу, касающуюся количественного определения глюкозы в безалкогольном напитке. Ожидается, что содержание может быть в районе 5 г/л. Рассмотрим три метода определения концентрации.

а) *Метод внешнего стандарта.* Готовится стандартный раствор около 6 г/л (не обязательно точно 6,000 г/л, но точно известная концентрация). Сигнал от стандарта дает пик площадью 5400. Сигнал от пробы дает пик площадью 3600.

$$\text{Калибровочный фактор (КФ)} = \frac{6}{5400} = 1,11 \cdot 10^{-3}$$

$$\text{Содержание} = \text{площадь пика образца} \cdot \text{КФ} = 3600 \cdot 1,11 \cdot 10^{-3} = 4\text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$$

¹ J. Asshauer and H. Ullner, *Practice of High Performance Liquid Chromatography*, H. Engelhardt, ed., Springer, Berlin, 1986, pp. 65—108; E. Katz (ed.) *Quantitative Analysis Using Chromatographic Techniques*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1987, 31—98; S. Lindsay, *High Performance Liquid Chromatography*, ACOL Series, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2nd ed., 1992., pp. 229—250 (с проблемами).

² Двухкомпонентные смеси могут быть количественно проанализированы без калибровочной хроматограммы или калибровочного графика. Готовят растворы одинаковой концентрации каждого чистого соединения и записывают УФ-спектры. Выбирают такую длину волны для детектирования, при которой линии спектров пересекаются (изобестическая точка). В этом случае отношение площадей пиков равно отношению содержания веществ в смеси при условии, что используемый УФ-детектор показывает высокую стабильность и отличную воспроизводимость при выборе данной длины волны (по крайней мере не более $\pm 0,2\text{ нм}$).



б) *Метод внутреннего стандарта.* К пробе и стандартному раствору (см. выше) добавляют в одинаковых количествах еще один компонент, который не присутствует в образце. В нашем случае была добавлена фруктоза до концентрации в растворе 10 г/л. Площади получившихся пиков: глюкоза в образце — 3600; глюкоза в стандарте — 5400; фруктоза в обоих растворах — 6300. Отношение количеств получается путем сравнения с соотношением сигналов:

$$K\Phi = \frac{\text{отношение количества стандарта}}{\text{отношение сигнала стандарта}} = \frac{6 \cdot 6300}{10 \cdot 5400} = \frac{0,6}{0,86} = 0,7$$

Отношение количества вещества в образце =

$$= \text{отношение сигналов} \cdot K\Phi = \frac{3600}{6300} \cdot 0,7 = 0,4$$

$$\begin{aligned} \text{Содержание} &= \text{количество внутреннего стандарта} \cdot \text{отношение количества} = \\ &= 10 \cdot 0,4 = 4 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \end{aligned}$$

в) *Метод стандартной добавки*¹. В пробу добавляют известное количество вещества, которое определяют. В нашем случае была сделана добавка глюкозы так, что ее содержание в растворе увеличилось на 5 г/л.

Площадь пика для первоначального образца — 3600, для образца с добавкой — 8100.

$$\text{Содержание} = \frac{\text{добавка} \cdot \text{сигнал образца}}{\text{разница сигналов}} = \frac{5 \cdot 3600}{8100 - 3600} = 4 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}.$$

Метод внешнего стандарта самый простой и поэтому должен использоваться только для обычных аналитических задач. Ввод пробы должен быть хорошо воспроизводим. Отсюда рекомендация использовать метод полного заполнения петли (см. раздел 4.6). При многоточечной калибровке не рекомендуется вводить различные объемы стандартных растворов (например, 10, 20, 30, 40 и 50 мкл), потому что вполне возможно, ни точность, ни прецизионность этих вводов пробы не будут достаточно высокими. Лучше для калибровки использовать растворы с разными концентрациями анализируемого вещества и вводить их в равных объемах (с полным заполнением петли и точно такую же процедуру использовать для анализа пробы).

В случае внутреннего стандарта в калибровке нет необходимости, и небольшие колебания объема ввода пробы становятся не так уж важны. При сложной или трудозатратной пробоподготовке настоятельно рекомендуется использовать метод внутреннего стандарта. В этом случае стандарт будет добавлен перед первым этапом пробоподготовки. Выбор подходящего внутреннего стандарта нелегкая задача. Он должен быть чистым, точно охарактеризованным соединением и вести себя сходным образом при пробоподготовке, хроматографическом разделении и детектировании, как и интересующее(ие) нас соединение(я). Если возможно, он должен выходить на хроматограмме отдельно от других пиков, но не в самом начале хроматограммы или ее конце. Примеры можно найти на рис. 6.11, 11.2, 11.6, 13.1, 13.2 и 22.4.

¹ DIN32633: Chemical analysis — Methods of standard addition — Procedure evaluation, Beuth, Berlin, 1998.

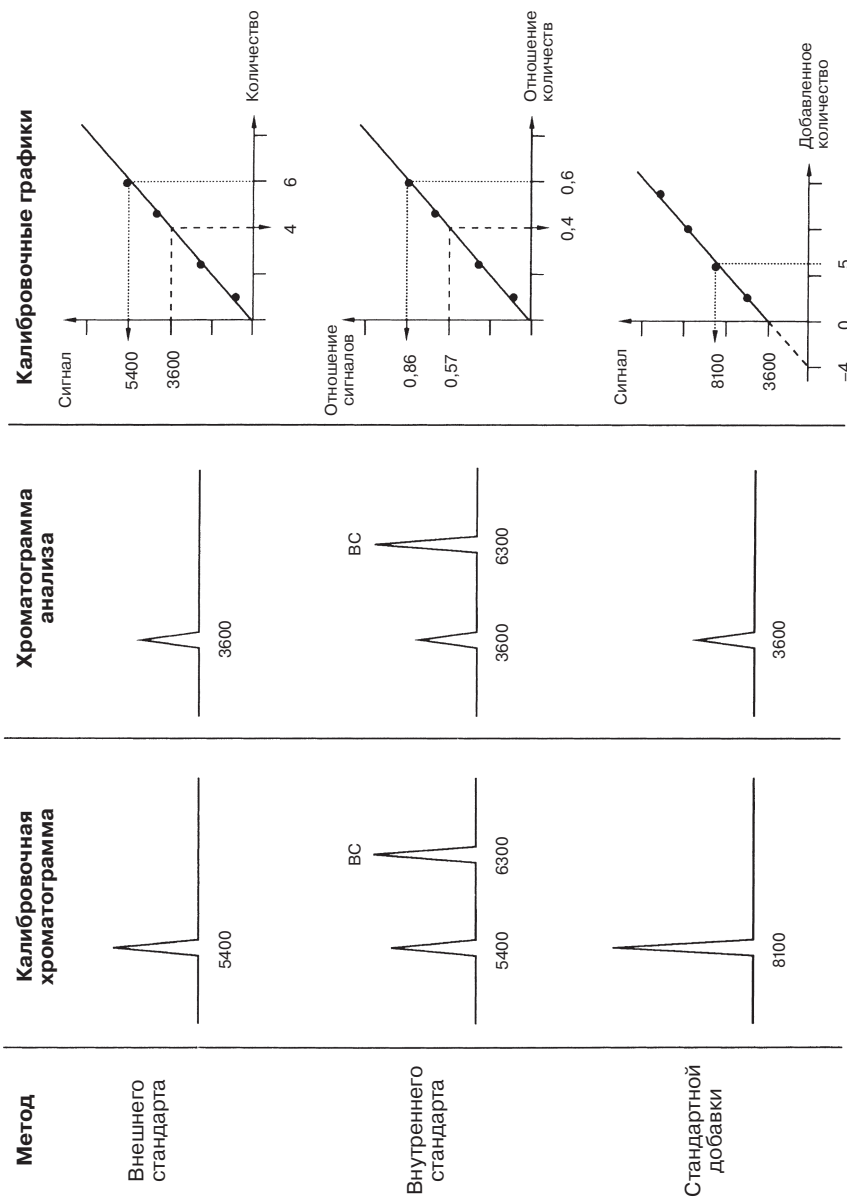


Рис. 19.3. Методы калибровки для количественного анализа

Стандартная добавка — простое и хорошее решение, если количество образца не ограничено. Это позволяет сделать калибровку для анализа в реальных условиях, т. е. без хроматограмм стандарта. Методы стандартной добавки и внутреннего стандарта могут быть объединены.

При проведении процесса валидации (см. раздел 20.3) необходимо определить, как часто нужно заново получать хроматограмму калибровочного раствора или строить калибровочный график. Необходимо всегда учитывать возможность принципиальных ошибок метода калибровочных графиков. Они показаны на рис. 19.4. Существует разница между *постоянной систематической погрешностью* и *пропорциональной систематической погрешностью*. В первом случае калибровочная прямая не проходит через начало координат. Отклонение может быть положительным (как на рисунке) и отрицательным. Этот тип ошибки не может быть распознан методом стандартной добавки! Прямая с пропорциональной ошибкой имеет другой наклон, который может быть слишком мал, как на рисунке, или слишком велик. Оба типа отклонений (погрешностей) могут возникать одновременно. Они могут быть обнаружены определением зависимости извлечения (раздел 19.4).

Для того чтобы найти *предел количественного определения* (ПКО), были предложены различные методы. В первую очередь необходимо определить наименьшее количество или концентрацию аналита, количественное определение которого может быть сделано с определенной точностью и воспроизводимостью.

Наиболее разумный подход — определение верхнего предела допустимого среднеквадратичного отклонения повторяемости и нахождение ПКО экспериментально¹. Для этого должны быть исследованы по крайней мере шесть

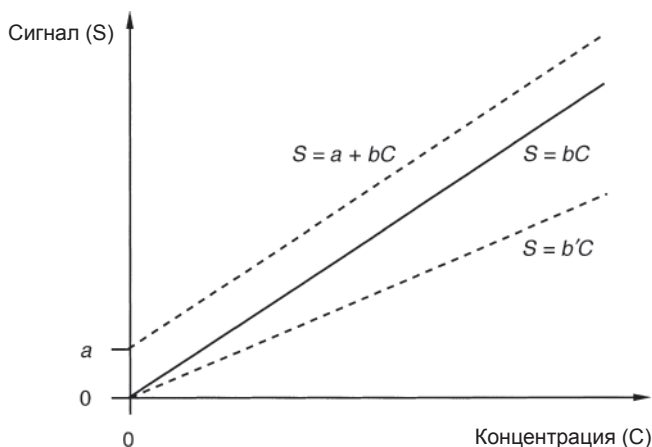


Рис. 19.4. Недостоверные калибровочные графики. Достоверный график — сплошная линия, которая проходит через начало координат и ее наклон b . Нижняя пунктирная кривая имеет пропорциональную систематическую погрешность, поскольку ее наклон b' другой. Верхняя пунктирная кривая имеет тот же наклон, но проходит через ось ординат в точке a , поэтому она имеет постоянную систематическую погрешность

¹ J. Vial, K. Le Mapihan and A. Jardy, *Chromatographia Suppl.*, **57**, S-303 (2003).

различных концентраций в районе ожидаемого ПКО, с не менее чем шестью определениями каждого.

Задача 36

Каждая из шести различных концентраций c калибровочного раствора с образцом была проанализирована по десять раз. Максимальная допустимая повторяемость, выраженная через относительное стандартное отклонение (ОСО), составляет 10 %. Были получены следующие данные:

$c = 5$ мд: 5,38 / 4,06 / 5,48 / 5,52 / 5,70 / 6,12 / 4,30 / 5,18 / 5,44 / 4,17 мд.
 $c = 10$ мд: 8,09 / 9,36 / 11,29 / 9,92 / 10,76 / 10,50 / 9,35 / 11,38 / 10,21 / 12,78 мд.
 $c = 15$ мд: 17,05 / 13,21 / 18,76 / 17,45 / 16,05 / 14,68 / 14,19 / 14,03 / 17,59 / 15,82 мд.
 $c = 20$ мд: 17,86 / 19,36 / 20,87 / 18,97 / 18,37 / 19,82 / 17,90 / 18,25 / 23,42 / 22,79 мд.
 $c = 25$ мд: 21,59 / 24,22 / 20,33 / 27,41 / 26,54 / 25,99 / 24,63 / 26,90 / 23,55 / 22,76 мд.
 $c = 30$ мд: 31,03 / 28,82 / 32,32 / 27,84 / 31,86 / 31,37 / 26,96 / 25,47 / 30,91 / 33,09 мд.

При какой концентрации наблюдается ПКО для данных условий?

Решение

$c = 5$ мд: среднее значение $\bar{x} = 5,14$ мд, стандартное отклонение $s(x) = 0,71$ мд, ОСО = 13,8 %.

$c = 10$ мд: $\bar{x} = 10,4$ мд, $s(x) = 1,31$ мд, ОСО = 12,6 %.

$c = 15$ мд: $\bar{x} = 15,9$ мд, $s(x) = 1,82$ мд, ОСО = 11,5 %.

$c = 20$ мд: $\bar{x} = 19,8$ мд, $s(x) = 2,00$ мд, ОСО = **10,1 %**.

$c = 25$ мд: $\bar{x} = 24,4$ мд, $s(x) = 2,37$ мд, ОСО = 9,7 %.

$c = 30$ мд: $\bar{x} = 30,0$ мд, $s(x) = 2,54$ мд, ОСО = 8,5 %.

ПКО — 20 мд.

ПКО зависит от аналита из-за разных свойств детектора и значения k . *Предел обнаружения* (ПО) — 30 % ПКО, т. е. в приведенном выше примере 7 мд.

Градиентное элюирование может быть источником дополнительной погрешности, поэтому количественный анализ, если это возможно, должен проводиться в изократическом режиме. Необходимо держать постоянными скорость потока (в случае определения площади пика) или состав подвижной фазы (в случае определения высоты пика) (как мы увидим ниже на рис. 19.5).

Образец следует растворять в подвижной фазе. Если растворитель, в котором растворяют образец, отличается от подвижной фазы, то анализ может стать менее точным¹. Кроме того, возможно, что отклик детектора сильно зависит от выбранного для образца растворителя² (см. также раздел 4.7).

Количественный анализ строго ограничен условиями: колонка не должна быть перегруженной и детектор должен работать в линейном диапазоне. Необходимо проверить соблюдение этих условий экспериментально. Точность может быть увеличена путем термостатирования колонки. Следует избегать

¹ M. Tsimidou and R. Macrae, *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 155 (1985); S. Perlman and J. Kirschbaum, *J. Chromatogr.*, **357**, 39 (1986); F. Khachik, G. R. Beecher, J. T. Vanderslice and G. Furrow, *Anal. Chem.*, **60**, 807 (1988).

² J. Kirschbaum, J. Noroski, A. Cosey, D. Mayo and J. Adamovics, *J. Chromatogr.*, **507**, 165 (1990).



асимметричных пиков. Результаты анализов могут быть подтверждены несколькими способами¹.

19.4. Извлечение²

Определение функции извлечения и коэффициента извлечения необходимо для того, чтобы обнаружить возможную ошибку в результате анализа, возникающую в процессе пробоподготовки или даже из-за природы самого образца.

Методика (извлечение при пробоподготовке)

а) Чистый образец сравнения анализируют без выполнения пробоподготовки (или без некоторых этапов подготовки пробы). Калибровочная зависимость рассчитывается по формуле:

$$y = a_0 + b_0 x_0,$$

где y — сигнал, x_0 — массы или концентрации образца сравнения, a_0 — пересечение с осью ординат, b_0 — наклон прямой.

б) Чистый образец сравнения анализируют после проведения процедуры пробоподготовки образца. Результат анализа рассчитывают, используя калибровочную зависимость:

$$x_p = \frac{y - a_0}{b_0},$$

где x_p — массы или концентрации образца сравнения после пробоподготовки.

в) Строится линейный график зависимости x_p от x_0 и функция извлечения записывается в виде формулы:

$$x_p = a_p + b_p x_0,$$

где индекс p обозначает параметры, найденные в процессе пробоподготовки образца.

г) Коэффициент извлечения (КИ) рассчитывается по формуле:

$$КИ = \left(\frac{a_p}{x_0} + b_p \right) \cdot 100\%.$$

Функция извлечения должна быть линейной, пересекать ось y в $a_p = 0$, и коэффициент наклона должен быть $b_p = 1$. Если $a_p \neq 0$, то присутствует постоянная систематическая погрешность, если $b_p \neq 1$, то присутствует пропорциональная систематическая погрешность пробоподготовки.

Функция и коэффициент извлечения могут быть определены для каждого отдельного этапа пробоподготовки. Это позволяет провести улучшение важнейших шагов пробоподготовки. После этого описанная выше процедура

¹ J. Kirschbaum, S. Perlman, J. Joseph and J. Adamovics, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 27 (1984).

² W. Funk, V. Dammann and G. Donnevert, *Quality Assurance in Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2nd ed., 2006.

может быть выполнена с обогащенными образцами для определения матричных эффектов.

Задача 37

Следующие данные площадей пиков для растворов афлатоксина были получены без предварительной подготовки образца:

10 нг	2432 единицы
20 нг	4829 единиц
30 нг	7231 единица
40 нг	9628 единиц

После пробоподготовки с использованием твердофазной экстракции получены следующие данные:

10 нг	1763 единицы
20 нг	4191 единица
30 нг	6617 единиц
40 нг	9050 единиц

Рассчитать зависимость извлечения и коэффициент извлечения. Оцените функцию извлечения.

Решение

Калибровочная кривая имеет линейную зависимость:

$$y = 32,5 + 240x_0.$$

Эта функция имеет значение в точке пересечения с осью y , не равное нулю (постоянная систематическая погрешность). Причина, вероятно, кроется в ВЭЖХ-разделении. Ее надо найти и устранить.

$$x_p(10) = \frac{1763 - 32,5}{240} = 7,2 \text{ нг.}$$

Аналогично найдены следующие значения: $x_p(20) = 17,3$ нг, $x_p(30) = 27,4$ нг, $x_p(40) = 37,6$ нг.

Используя пары данных (7,2; 10), (17,3; 20), (27,4; 30) и (37,6; 40), находим функцию извлечения в виде линейной зависимости:

$$x_p = -2,91 + 1,01x_0.$$

Угол наклона почти идеальный, но есть небольшая (1 %) пропорциональная систематическая погрешность. Пересечение с осью y говорит о постоянной систематической погрешности; можно видеть, что содержание афлатоксина занижено на 2,9 мг. Качество твердофазной экстракции должно быть улучшено.

Из-за этой ошибки коэффициент извлечения зависит от абсолютной массы образца:

$$\text{КИ (10)} = \left(\frac{-2,91}{10} + 1,01 \right) 100\% = 71,9\%.$$

Аналогично, $\text{КИ}(20) = 86,5\%$, $\text{КИ}(30) = 91,3\%$ и $\text{КИ}(40) = 93,7\%$.



19.5. Определение высоты и площади пика для количественного анализа¹

Для хорошо разрешенного пика площадь, а также его высота пропорциональны количеству анализируемого вещества. Поэтому любая из этих величин может быть выбрана для количественного анализа. Пожалуй, определение по площади² более точное, но это утверждение должно быть проверено в ходе валидации метода (раздел 20.3). Определение по площади является сложной задачей для интегратора, если отношение сигнал/шум маленькое. В этом случае для количественного определения микропримесей лучше использовать высоту пика.

Необходимо обратить внимание на два вопроса количественной оценки пика: влияние внешних факторов на площадь и высоту пика и ошибку, происходящую из-за перекрывания пиков.

Влияние удерживания и скорости потока на высоту и площадь пика

На рис. 19.5 показано влияние этих параметров на количественное определение.

а) В изократическом разделении высота пика сильно зависит от времени удерживания вещества, т.е. от процентного содержания элюента с большей элюирующей способностью (элюент В). Рано выходящие пики (при высоком %В) узки и высоки, тогда как пики, выходящие позже (при низком %В), широки и низки. Для количественного анализа по высоте пика необходимо, чтобы состав подвижной фазы не изменялся между калибровкой и анализом проб (например, из-за испарения из готовой смеси подвижной фазы компонента с низкой температурой кипения в течение дня). Высота пика гораздо меньше подвержена влиянию изменения скорости потока и определяется уравнением Ван-Деемтера.

б) При использовании детекторов, чувствительных к концентрации, площадь пика сильно зависит от скорости потока подвижной фазы. Если вещество проходит медленно через ячейку детектора, то пик будет уширяться, но его высота определяется только концентрацией в максимуме пика и, следовательно, площадь пика будет большой. Если вещество быстро пройдет через ячейку, площадь пика будет небольшой. Как следствие, для количественного анализа необходимо использовать насос с очень стабильной скоростью потока, даже если противодавление системы меняется. Изменение в %В на площадь пика почти не влияет.

¹ S. T. Balke, *Quantitative Column Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1984, pp. 147—162; N. Dyson, *Chromatographic Integration Methods*, Royal Society of Chemistry, London, 2nd ed., 1998, pp. 83—85; H. J. Kuss, and S. Kromidas, eds. *Quantification in LC and GC*, Wiley-VCH, Weinheim, 2009.

² R. E. Pauls et al., *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 273 (1986).

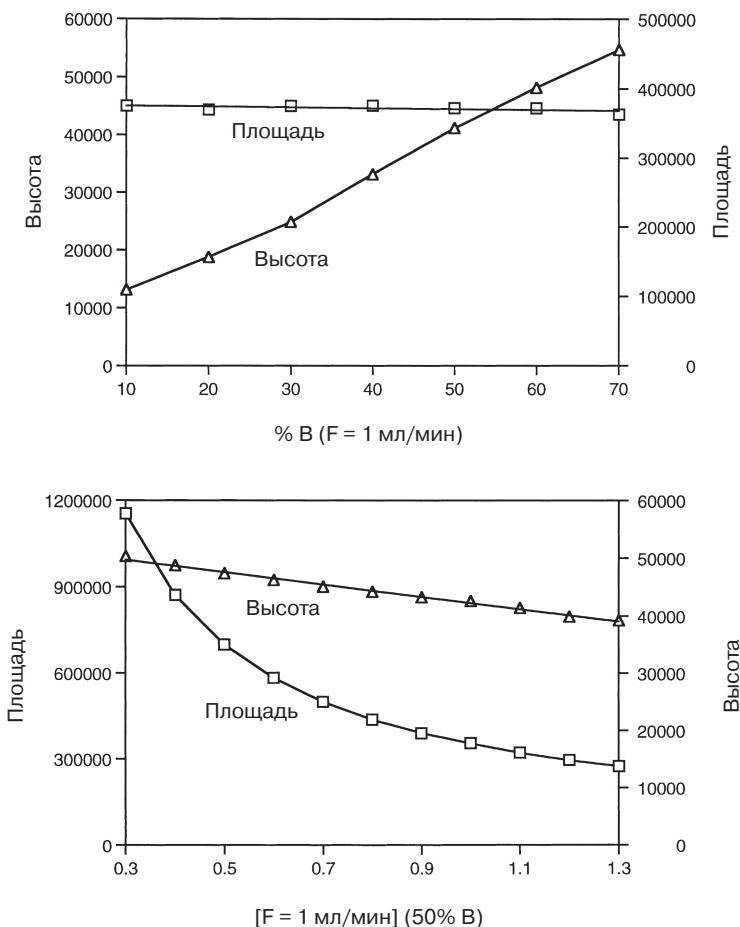


Рис. 19.5. Влияние %В и скорости потока элюента на площадь пика и высоту. Условия: образец — 10 мкг фенола, растворенного в смеси вода-метанол (1:1); колонка 250×3,2 мм; стационарная фаза Spherisorb ODS, 5 мкм; подвижная фаза вода-метанол; УФ, 254 нм. Числа на вертикальных осях — единицы высоты и площади, которые считает интегратор

Перекрывающиеся Пики¹

Перекрытие пиков является существенной причиной ошибок в количественном анализе. Эта причина становится ясна при взгляде на рис. 19.6. Если интегратор разделяет два пика вертикальной линией, то некоторая часть площади одного пика становится частью площади другого пика и наоборот.

¹ V. R. Meyer, *J. Chromatogr. Sci.*, **33**, 26 (1995); V. R. Meyer, *Chromatographia*, **40**, 15 (1995); V. R. Meyer, *LC GC Int.*, **7**, 94 (1994) или *LC GC Mag.*, **13**, 252 (1995).

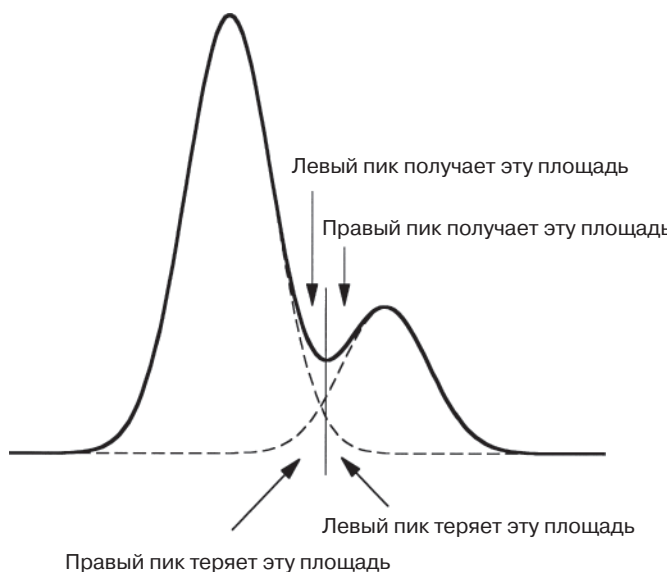


Рис. 19.6. Пара перекрывающихся пиков и области их перекрывания, когда используется вертикальная линия для разделения

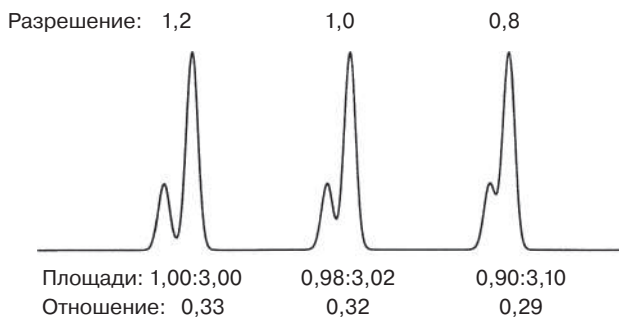
Аналогично, если деление выполняется по касательной вместо вертикальной линии, то оно будет неточным (этот метод часто используется для небольших пиков «наездников»). На рис. 19.7 показаны эффекты, связанные с различными разрешениями, асимметриями и порядками выхода пиков. По отношению к площадям эффекты могут быть обобщены следующим образом:

- 1) для пиков гауссовой формы (симметричных), независимо от порядка элюирования, площадь большего пика будет завышена и меньшего — занижена. Ошибки не будет только в случае, если у нас два симметричных пика одинакового размера, отделенных друг от друга вертикальной линией;
- 2) для пиков, у которых уширен задний фронт, площадь первого пика будет занижена, а второго — завышена, независимо от соотношения размеров;
- 3) отношение относительных ошибок обратно пропорционально отношению площадей пиков. Относительная ошибка определения площади меньшего пика больше, чем относительная ошибка определения площади большего пика.

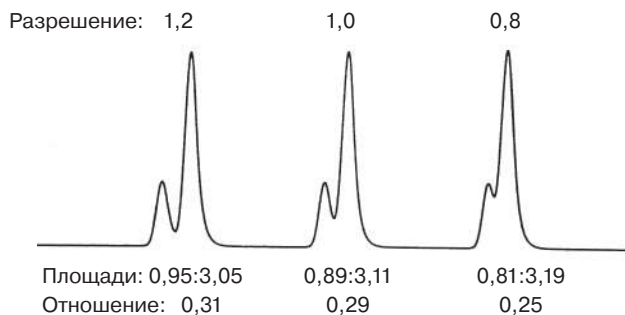
Некоторые рекомендации, помогающие избежать ошибок такого типа:

- а) достичь разрешения пиков! Необходимое разрешение зависит от соотношения размеров пиков. Разрешение 1,5 может оказаться достаточным для пиков сходных по размеру, но не является достаточным для экстремальных соотношений площадей пиков, например 20:1 и больше;
- б) определение высоты пика часто более точное, чем определение площади пика. Количественное определение по высоте пика почти безошибочно, даже в случае уширения заднего фронта пика, если меньший пик выходит впереди большего;
- в) избегайте уширения заднего фронта пика. Уширение уменьшает разрешение и плохо влияет на подсчет площади малых пиков, расположенных вслед

Пики гауссовой формы, площади = 1:3, отношение = 0,33



Уширение заднего фронта пика = 1,5, площади = 1:3, отношение = 0,33



Уширение заднего фронта пика = 1,5, площади = 1:3, отношение = 0,33

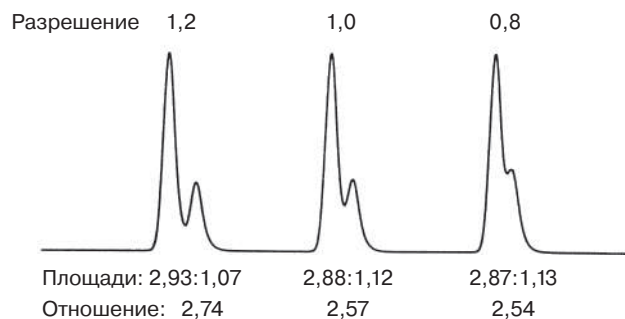


Рис. 19.7. Перекрывающиеся пики и их области при интегрировании, когда используется вертикальная линия для разделения. Соответственно, истинные площади всегда соотносятся как 1:3 или 3:1

за большими. Для его уменьшения следует минимизировать внеколоночный объем системы, использовать колонку с отличной упаковкой, подходящие элюенты, которые позволяют осуществлять быстрый массообмен между подвижной и неподвижной фазой, подходящий растворитель для образца и не допускать перегрузки колонки.



19.6. Ошибки интегрирования

При использовании электронных интеграторов и систем сбора данных надо понимать, что некоторые возможные ошибки в результате их использования могут быть упущены из виду. Для ознакомления с этими проблемами полезно прочитать просто написанную книгу Дайсона¹ или некоторые обзоры на эту тему². Могут возникнуть различные виды ошибок, наиболее важные из них представлены на рис. 19.8.

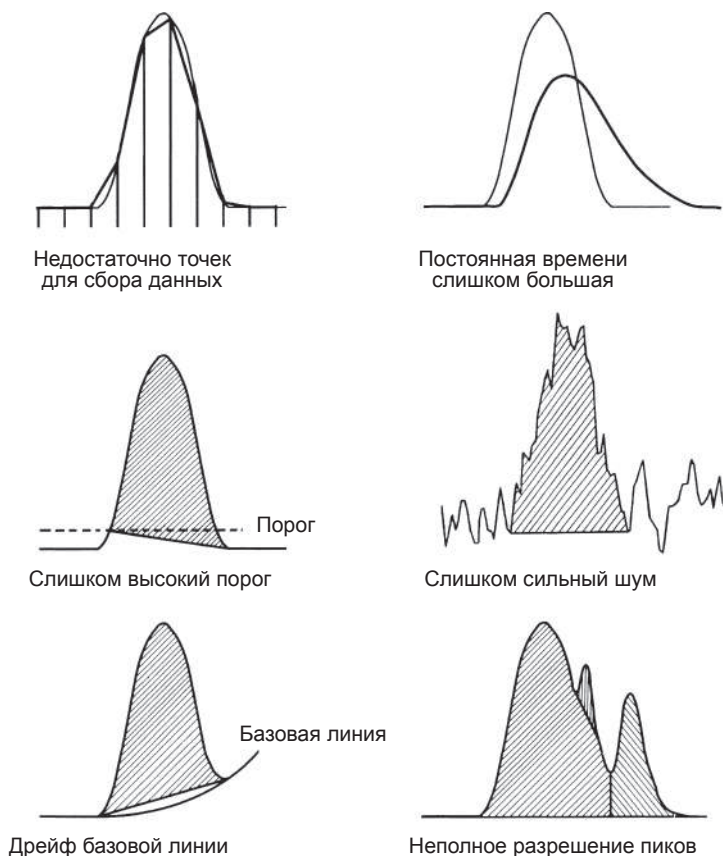


Рис. 19.8. Ошибки интегрирования. Заштрихованы площади, обсчитываемые интегратором

¹ N. Dyson, *Chromatographic Integration Methods*, Royal Society of Chemistry, London, 2nd edn, 1998.

² K. Ogan, in *Quantitative Analysis using Chromatographic Techniques*, E. Katz, ed., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 1987, p. 31; D.T. Rossi, *J. Chromatogr. Sci.*, **26**, 101 (1998); E. Grushka and I. Zamir, *High Performance Liquid Chromatography*, P.R. Brown and R.A. Hartwick, eds, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1989, pp. 529–561.

Типы ошибок

1) *Недостаточно точек для сбора данных.* Для того чтобы получить пик правильной формы, необходимо зарегистрировать его по меньшей мере по десяти точкам. Если сбор данных идет слишком медленно, то его площадь и, возможно, его высота не будут правильными. В этом случае сглаживание с помощью интегратора полученных данных не поможет. Для регистрации данной хроматограммы потребуется выбрать другую скорость сбора данных.

2) *Постоянная времени слишком большая.* Медленно работающие электронные устройства, расположенные в детекторе или интеграторе, искажают сигнал. В принципе на площадь пика это не влияет, а вот высота пика уменьшается и увеличивается уширение заднего фронта пика. Скорее всего, окажется, что площадь пика немного сократилась, а разрешение с соседними пиками уменьшилось.

3) *Слишком большой порог.* Интеграторы распознают пик, если его сигнал выше, чем базовая линия. Порог можно задать, и он должен быть выше, чем шум. В любом случае уменьшается площадь пика и высота.

4) *Слишком сильный шум.* Очевидно, что если отношение сигнал/шум слишком мало, то правильную разметку пика сделать невозможно. Результат будет случайным даже для систем сбора данных, которые позволяют определять базовую линию путем вычислений после завершения анализа. Для определения площади пика отношение сигнал/шум должно быть не менее 10.

5) *Дрейф базовой линии.* Как правило, интегратор чертит прямую базовую линию. Если реальная базовая линия искривлена, рассчитанная площадь будет меньше (как показано) или больше истинного значения.

6) *Неполное разрешение пиков.* Рисунок показывает только две типичные проблемы. Что лучше использовать: касательную или вертикальную линию? За исключением идеальных случаев, неполное разрешение пиков всегда приводит к ошибкам в интегрировании. Еще более вредна асимметрия пика (см. раздел 19.5).

Во многих случаях ошибки интегрирования не могут быть скомпенсированы путем введения стандартов и определения градуировочных коэффициентов, поскольку стандартная смесь обычно менее сложна, чем образец.

19.7. Длина волны детектирования

При использовании обычного УФ-детектора необходимо выбрать определенную длину волны для детектирования (данный случай не относится к детектору с диодной матрицей). Для этого надо принять во внимание несколько моментов:

1) УФ-спектры различных компонентов пробы. Особенно важны длины волн максимумов поглощения;

2) коэффициент экстинкции в максимуме поглощения и на длине волны, которая будет выбрана;

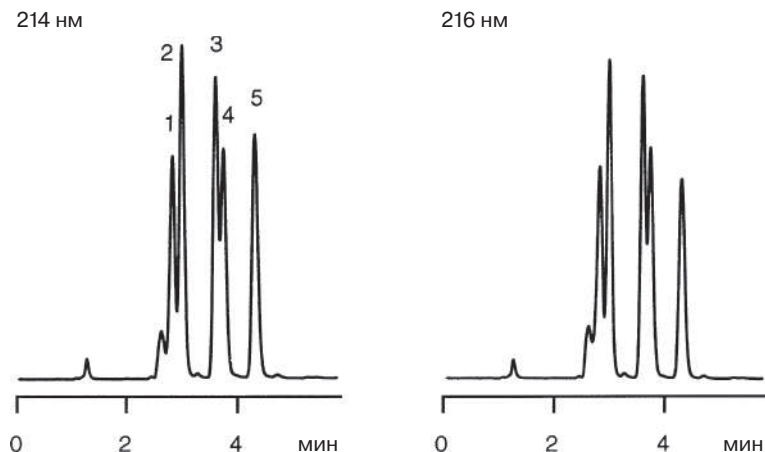


Рис. 19.9. Анализы взрывчатых веществ при изменении длины волны на 2 нм. Условия: колонка 250×4,0 мм; стационарная фаза LiChrospher 60 RP-Select B, диаметр частиц 5 мкм; подвижная фаза вода-ацетонитрил (30:70), расход 1 мл/мин. Пики: 1 — октоген; 2 — гексоген; 3 — тетрил; 4 — тринитротолуол; 5 — пентрит

3) коэффициенты удерживания различных компонентов пробы, если разделение проходит в изократическом режиме (пики уширяются постепенно и, следовательно, их высота уменьшается);

4) важность различных компонентов пробы различна (в некоторых случаях нужно количественно определить только одно соединение).

Чем меньше пик, тем больше на него влияет отношение сигнал/шум. Точность и, кроме того, правильность количественного определения, скорее всего, уменьшатся. Поэтому пики определяемых соединений должны выходить раньше и детектироваться при максимумах их абсорбции. Как правило, при более коротких длинах волн детектирования анализ становится менее устойчивым, так как имеется больший шанс проявления системных пиков (раздел 19.9), а при градиентном разделении базовая линия более подвержена дрейфу.

Очевидно, что необходимо проверять выбранную длину волны и выполнять проверку детектора (глава 25) регулярно, для того чтобы гарантировать точность измерений на протяжении месяцев и даже лет. Даже незначительное отклонение от правильной длины волны может сильно повлиять на результат анализа. Такая правильная длина волны (рис. 19.9) для определения пентрита (последний пик) должна быть 214 нм, так как на ней наблюдается максимум поглощения этого соединения. Если длина волны изменится на 216 нм из-за неправильной настройки или незамеченного изменения оптики прибора, площадь пика пентрита падает до 85 % от его действительного значения, в то время как площади других пиков практически не изменятся.

19.8. Дериватизация¹

Детектирование — большая проблема, сопровождающая использование ВЭЖХ. Если не могут быть использованы высокочувствительные детекторы, например флуоресцентный, то предел обнаружения становится значительно выше, чем для газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. В жидкостной хроматографии дериватизация является способом увеличения предела обнаружения².

Дериватизация — это изменение образца определенным образом с помощью химической реакции, которая может осуществляться как до ввода образца в хроматографическую систему (предколоночная дериватизация), так и между колонкой и детектором (постколоночная дериватизация).

Предколоночная дериватизация

Преимущества:

- 1) могут быть выбраны любые условия реакции;
- 2) реакция может протекать медленно;
- 3) дериватизация может служить одним из этапов очистки и первичной обработки;
- 4) избыток реагента может быть удален;
- 5) этот вид дериватизации может также улучшить хроматографические свойства образца (например, вещество быстрее выходит и у него меньше уширяется задний фронт).

Недостатки:

- 1) в результате реакции (часто длительной) могут образовываться побочные продукты;
- 2) реакция должна проходить с количественным выходом;
- 3) продукты дериватизации становятся хроматографически более похожими в результате реакции, вследствие чего может снизиться селективность разделения.

Постколоночная дериватизация: реакторы³

В этом случае реагент добавляется в элюат. В целом предпочтительнее высокая концентрация раствора реагента, так как это сводит эффекты разбавления к минимуму. Как правило, химические реакции идут быстрее при более высоких температурах, поэтому ячейку для реакции часто подогревают.

¹ I. S. Krull, Z. Deyl and H. Lingeman, *J. Chromatogr. B*, **659**, 1 (1994); Derivatization for fluorescence detection: H. Lingeman et al., *J. Liquid Chromatogr.*, **8**, 789 (1985).

² Цель дериватизации в газовой хроматографии — увеличение летучести и термостабильности образца.

³ U. A. T. Brinkman, *Chromatographia*, **24**, 190 (1987); W. J. Bachman and J. T. Stewart, *LC GC Mag.*, **7**, 38 (1989); U. A. T. Brinkman, R. W. Frei and H. Lingeman, *J. Chromatogr.*, **492**, 251 (1989). Практические проблемы постколоночной дериватизации обсуждены здесь M. V. Pickering, *LC GC Int.*, **2**(1), 29 (1989). Biochemical reaction detectors: J. Emneus and G. Marko-Varga, *J. Chromatogr. A*, **703**, 191 (1995).



Преимущества:

- 1) реакция может быть неколичественной;
- 2) дополнительный детектор может быть добавлен до дериватизации, например колонка → УФ-детектор → реактор с флуоресцентным реагентом → флуоресцентный детектор;
- 3) могут быть установлены системы высокоспецифического обнаружения, такие как иммуноанализ¹;
- 4) можно проанализировать соединения, которые дают идентичные продукты реакции (например, формальдегид), поскольку разделение происходит до детектирования.

Недостатки:

- 1) используемая подвижная фаза, в которой должна произойти реакция, ограничивает возможности;
- 2) дериватизационный агент сам по себе не должен быть детектируемым. Постколоночная дериватизация с целью увеличения УФ-поглощения практически невозможна, так как все подходящие реагенты для дериватизации сильно поглощают в УФ-области.

Три наиболее важных типа устройств для дериватизации:

а) *открытые капилляры*. Чем меньше диаметр капилляра, тем меньше уширяется пик; лучше всего подходит капилляр с диаметром 0,3 мм. Капилляр, изогнутый определенным образом², служит для хорошего перемешивания жидкости, таким образом, минимизируется уширение пика, что является большим преимуществом. Капилляры подходят для времени реакции не более 1 мин (для некоторых изогнутых капилляров до 5 мин);

б) *колонка-реактор*. Эти колонки упакованы непористыми материалами, такими как стеклянные бусины/шарики (такая упаковка необходима, поскольку делает возможным поперечный поток). Колонки подходят для реакций длительностью от 0,5 до 5,0 мин. Активатором реакции может быть катализатор или иммобилизованный фермент³;

в) *сегментированные системы*. Поток жидкости разделяется на малые порции с помощью пузырьков воздуха или несмешивающегося растворителя, если реакция идет медленно (до 30 мин). Таким образом предотвращают уширение пика. Фазы, как правило, разделяются до детектора, а шум может быть подавлен электронными средствами.

На следующих рисунках приведены примеры сложных разделений, в которых применяли дериватизацию.

Рис. 12.7: лантаноиды были превращены в цветные комплексы с помощью постколоночной дериватизации с 4-(2-пиридилазо)резорцином. Нет никакой информации об устройстве для дериватизации.

¹ I. S. Krull et al., *LC GC Int.*, **10**, 278 (1997) или *LC GC Mag.*, **15**, 620 (1997); A. M. Girelli and E. Mattei, *J. Chromatogr. B*, **819**, 3 (2005).

² H. Engelhardt, *Eur. Chromatogr. News*, **2**(2), 20 (1988); B. Lillig and H. Engelhardt, *Reaction Detection in Liquid Chromatography*, I. S. Krull, ed., Dekker, New York, 1986.

³ Y. I. Nie and W. H. Wang, *Chromatographia Suppl.*, **69**, S-5 (2009).

Рис. 13.2: для α -кетокислот была проведена предколоночная дериватизация в течение 2 ч при 80 °С с *o*-фенилендиамином, полученные соединения хиноксалинола флуоресцировали.

Рис. 16.6: постколоночная дериватизация изоферментов лактатдегидрогеназы с помощью лактат + НАД⁺ либо пируват + НАДН, добавленными после колонки. Реактором была 100×5 мм колонка, упакованная 150-мкм стеклянными шариками (с привитыми диольными группами) при 40 °С. Принцип обнаружения: НАДН поглощает при 340 нм, в то время как НАД⁺ не поглощает.

Рис. 18.1 и 18.3: постколоночная дериватизация аминокислот с помощью нингидрина. Реакция проходила в изогнутом капилляре в течение 2 мин при 130 °С.

Рис. 18.9: постколоночная дериватизация тобрамицина (аминогликозид) *o*-фталевым альдегидом в 1,83 м × 0,38 мм капилляре. Флуоресцирующие продукты являются результатом сочетания этого реагента и аминов в реакции, которая продолжалась 6 с.

Рис. 22.4: для успешного разделения энантиомеров пропранолола на хиральных стационарных фазах молекулы должны иметь жесткую структуру. Это было достигнуто с помощью предколоночной дериватизации пропранолола с фосгеном. Этот реагент дает оксазолидоновое кольцо со спиртом и вторичной аминогруппой. Реакция происходит быстро при 0 °С.

Рис. 22.5: одна из возможностей разделения энантиомеров заключается в реакции представляющих интерес соединений с энантиомерно чистыми, хиральными реагентами для получения диастереомеров. При правильном выборе реагента диастереомеры можно будет разделить на обращенной фазе (или другой нехиральной стационарной фазе). В случае представленного здесь разделения была проведена количественная предколоночная дериватизация с хлорформином в течение 30 мин.

Рис. 23.1: после колонки был установлен микроколоночный реактор 20×0,34 мм, содержащий иммобилизованную 3 α -гидрокси-стероиддегидрогеназу. NAD⁺, необходимый для реакции, был добавлен к подвижной фазе; следовательно, не требовалось ни второго насоса, ни смешивающего тройника между колонкой и реактором. 3 α -гидроксигруппы желчных кислот были окислены до кетонов в реакторе, образовавшийся NADH был зарегистрирован с помощью флуоресцентного детектора.

19.9. Неожиданные пики: пики-призраки и системные пики

Появление неожиданных положительных или отрицательных пиков на хроматограмме возможно в любой момент. Если эти пики не могут быть воспроизведены, они называются *пиками-призраками*¹. Необходимо устранить их, хотя это может быть утомительным и трудоемким занятием.

¹ S. Williams, *J. Chromatogr. A*, **1052**, 1 (2004).

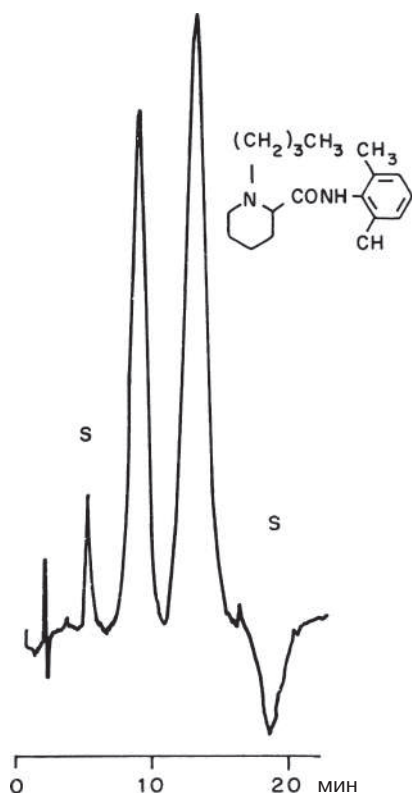


Рис. 19.10. Площади пиков и системные пики. (Воспроизведено с разрешения Elsevier Science Publishers BV G. Schill и J. Crommen, *Trends Anal. Chem.*, **6**, 111 (1987).) Два пика, обозначенные *S*, являются системными пиками. Образец — рацемат бупивакаина (соотношение изомеров 1:1); стационарная фаза — EnantioPac (α_1 — кислый гликопротеин на силикагеле); подвижная фаза — фосфатный буфер (pH 7,2) — изопропанол (92:8), УФ-детектор, 215 нм (подвижная фаза поглощает на данной длине волны)

Причинами возникновения пиков-призраков могут быть: пузырьки воздуха в детекторе, примеси в подвижной фазе, явление неполного смешивания подвижной фазы, подтекание колонки, недостаточное время уравнивания колонки после градиента, привнесенные примеси из предыдущего ввода¹ и многие другие.

Как показано на рис. 13.3 и 22.2, постоянно воспроизводимые непредвиденные пики являются *системными пиками*². Они всегда возникают, когда подвижная фаза представляет собой смесь нескольких компонентов, при условии, что используется детектор, чувствительный хотя бы к одному из этих компонентов. Например, если элюент содержит незначительное количество ароматических соединений и если детектирование осуществляется при 254 нм.

¹ J.W. Dolan, *LC GC Int.*, **7**, 74 (1994).

² J. Srbeek et al., *J. Sep. Sci.*, **28**, 1263 (2005).

В непрямом детектировании (раздел 6.9) системные пики всегда должны быть учтены. В самом деле, переход от прямого к непрямому детектированию может быть затяжным. Всегда возможны сюрпризы, если УФ-детектирование проводится на меньшей, чем обычно, длине волны для того, чтобы получить более низкий предел обнаружения. Системные пики, если они не определены, могут составлять помеху качественному и количественному анализу (их определение может быть трудным, потому что системные пики могут быть даже невидимы!)¹. Они могут вызвать сжатие пика или удвоение пиков². В фазовых системах с системными пиками площади отдельных пиков зависят от их положения по отношению к системному пику! Поэтому не равны по площади пики двух энантиомеров бупивакаина на рис. 19.10, который был введен в систему в виде рацемата.

¹ T. Arvidsson. *J. Chromatogr.*, **407**, 49 (1987).

² T. Fornstedt, D. Westerlund and A. Sokolowski, *J. Liquid Chromatogr.*, **11**, 2645 (1988).

ГЛАВА 20

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА¹

20.1. Стоит ли тратить на это силы?

Лабораторные анализы имеют смысл только тогда, когда их результаты достоверны. В научном смысле это утверждение требует, чтобы анализы и их результаты являлись достаточными, достоверными и точными.

Достаточность подразумевает, что аналитическая задача может быть решена с помощью соответствующего метода. Представьте ион-селективный электрод, который позволяет выяснить быстро и дешево, что количество кадмия в образце питьевой воды гораздо ниже предельно допустимого уровня. В этом случае нет необходимости проводить дальнейшие исследования. Однако бывают ситуации, когда следовая концентрация должна быть известна точно. Для этого требуется довольно много оборудования, персонала, времени и денег.

Достоверность означает, что анализ дает истинный результат. Это утверждение не так очевидно, как может показаться, поскольку «истинное значение» количества или концентрации неизвестно в принципе. Мы можем только попытаться получить как можно меньшую разницу между найденным и истинным значением. Найденное значение может быть проверено с помощью альтернативных аналитических методов (раздел 20.2) и путем участия в межлабораторных тестах.

Точность означает, что разброс результатов является низким, если повторить анализ этого же материала, т.е. стандартное отклонение небольшое. В большинстве случаев высокая точность достижима только при больших усилиях, как это описано выше. Высокая точность имеет смысл, только если она сопровождается высокой достоверностью.

В этой главе рассматриваются некоторые методы и оборудование для обеспечения качества, но исчерпывающее представление о них невозможно в пределах этой книги. Если вы новый менеджер по качеству в компании — читайте многочисленные доступные учебники и другие материалы, которые позволят вам быстро ознакомиться с данной темой.

¹ W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert and S. Ianelli, *Quality Assurance in Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2nd edn, 2007; E. Prichard and V. Barwick, *Quality Assurance in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2007; P. Konieczka and J. Namiesnik, *Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory*, CRC Press, Boca Raton, 2009; I. N. Papadoyannis and V. F. Samaridou, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, **27**, 753 (2004).

20.2. Подтверждение вторым методом

Хороший подход для подтверждения количественных результатов — исследование образца еще одним методом. Последний должен отличаться от оригинального метода, насколько это возможно, например вместо ВЭЖХ можно использовать газовую или тонкослойную хроматографию. Поскольку пробоподготовка часто является главной причиной недостоверности результатов, настоятельно рекомендуется использовать различные методы пробоподготовки для двух методов. При одинаковых количественных результатах в обоих случаях, можно предположить, что они являются достоверными. Если результаты различаются, то необходимо найти причину (или несколько причин), хотя такие усилия могут быть утомительными и трудоемкими.

Urakova и др., например, сравнили анализы хлорогеновой кислоты в экстрактах зеленых зерен кофе, сделанные методами тонкослойной хроматографии на силикагеле (т.е. нормально-фазовой жидкостной хроматографии) и обращенно-фазовой ВЭЖХ¹. Валидационные данные (предел обнаружения ПО, предел количественного обнаружения ПКО, воспроизводимость и различные точностные параметры), полнота извлечения и количественные результаты были полностью сопоставимы. Можно предположить, что оба метода находят «истинное» значение. Любой метод может быть использован в зависимости от предпочтений или инструментального оснащения лаборатории.

Этот вид проверки является обязательным для совершенно новых процедур и для образцов со сложным составом. Очевидно, что проверка проводится предпочтительно для валидации (раздел 20.3) метода, который будет выбран окончательно.

20.3. Метод валидации²

Валидация — это процедура, которая показывает, что данный метод может дать необходимые результаты надежным способом, с подходящей точностью и достоверностью. Само собой разумеется, невозможно дать набор правил на все случаи жизни, как правильно проводить валидацию, однако несколько или все из следующих пунктов должны быть учтены.

а) *Селективность* (или *специфичность*) — умение находить и количественно оценивать интересующее нас соединение в присутствии других соединений. Для хроматографических методов это означает, что анализируемое вещество может быть отделено с достаточным разрешением от всех сопутствующих пиков и что оно может быть обнаружено с помощью подходящего оборудования.

б) *Линейность* — свойства калибровочной кривой (раздел 19.3). Она должна быть прямой и проходить через начало координат. Все отклонения должны быть известны; желательно, чтобы они были объяснены.

¹ I. N. Urakova et al., *J. Sep. Sci.*, **31**, 237 (2008).

² J. Ermer and J. H. M. Miller, eds., *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim 2005; D. M. Bliesner, *Validating Chromatographic Methods*, Wiley, Chichester, 2006; A. G. Gonz_alez and M. A. Herrador, *Trends Anal. Chem.*, **26**, 227 (2007); G. A. Shabir et al., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, **30**, 311 (2007).



в) *Рабочий диапазон* — четко определенный диапазон подтвержденных количеств или концентраций. Он может быть меньше, чем линейный диапазон калибровочной кривой. Анализы, выполненные вне рабочего диапазона, недействительны, следовательно, такие результаты не могут иметь силы.

г) *Точность* — возможность повторно выполнить анализ с малым стандартным отклонением. Необходимо делать различие между повторяемостью (анализ повторяется через короткий промежуток времени, на одном и том же оборудовании, одним и тем же человеком, в одной и той же лаборатории) и воспроизводимостью (анализ повторяется после долгого времени, другими людьми, на другом оборудовании и/или в другой лаборатории).

д) *Достоверность* — возможность выполнения анализа с небольшой разницей между «истинным» и найденным значением. (Примечание: «истинное» значение неизвестно.)

е) *Степень извлечения* (раздел 19.4) — концентрация, в которой анализируемое вещество находится в образце. Степень извлечения и его повторяемость должны быть известны. Стопроцентное извлечение — это конечная цель, но часто оказывается, что ее невозможно достичь. Во многих случаях степень извлечения является наиболее важным фактором, влияющим на точность.

ж) *Низкие пределы обнаружения* в случае анализа следовых количеств — способность анализировать образцы с низким содержанием вещества; чувствительность анализа имеет нижнюю границу. Обратите внимание на разницу между ПКО и ПО, который составляет приблизительно одну треть ПКО (раздел 19.3). Иногда ПО определяется как тройная высота сигнала шума.

з) *Неопределенность измерений* в случае количественного анализа (см. раздел 20.5).

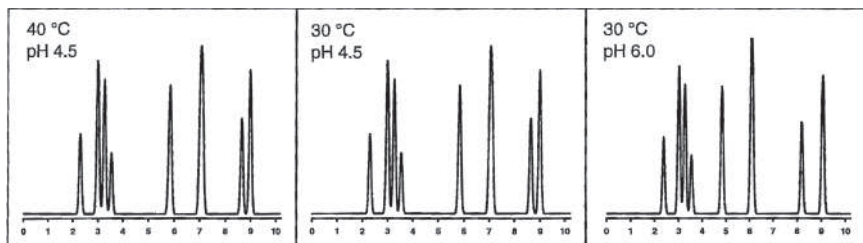
и) *Устойчивость*¹ — нечувствительность метода к изменению внешних параметров (см. конец раздела 18.6). Она зависит от конкретного метода и аналитической задачи, от того, сколько параметров необходимо контролировать более или менее строго: температуру, состав подвижной фазы, свойства детектора, пробоподготовку, персонал (может ли анализ быть выполнен кем угодно или только специалистами) и лабораторное помещение (можно ли использовать данную методику и в другом месте). Этот список не является полным. Что касается устойчивости методики, то неожиданности никогда не могут быть исключены, особенно в том случае, если необходимо проводить анализ в другой лаборатории (см. также обсуждение способа переноса в разделе 17.2). Устойчивость следует определять из статистического оформления экспериментов, а для этого надо получить определенное число достоверных результатов². Для завершенности требуется логически обоснованный план экспериментов, который в качестве положительного побочного эффекта приводит к более глубокому пониманию метода.

¹ J. W. Dolan, *LC GC Eur.*, **19**, 268 (2006) или *LC GC North Am.*, **24**, 374 (2006); B. Dejaegher and Y. Vander Heyden, *LC GC Eur.*, **19**, 418 (2006).

² S. N. Deming and S. L. Morgan, *Experimental Design: A Chemometric Approach*, Elsevier, Amsterdam, 2nd edn, 1993; R. B. Waters and A. Dovletoglou, *J. Liquid Chromatogr. Rel. Tech.*, **26**, 2975 (2003); Y. Vander Heyden, *LC GC Eur.*, **19**, 469 (2006); B. Dejaegher and Y. Vander Heyden, *LC GC Eur.*, **20**, 526 (2007) и **21**, 96 (2008). Пример применения: M. Enrique et al., *J. Chromatogr. Sci.*, **46**, 828 (2008).

Задача 38

Исходное разделение при 30 °C и pH 4,5 (в середине). Анализировалось два параметра — температура и pH. Что можно сказать об их устойчивости?



Решение

Метод устойчивый по отношению к температуре (по крайней мере, в исследованном диапазоне), но не к изменению pH. При pH 6 три пика элюируют с более коротким временем удерживания. Необходимо отметить этот факт в стандартной операционной процедуре (раздел 20.4). Как упоминалось выше, в дополнение к температуре и pH должно быть изучено влияние других параметров.

Рекомендуется создать подробные инструкции (которые на самом деле есть стандартные операционные процедуры) о том, как выполнять валидацию согласно требованиям данной компании или лаборатории. Валидация обязательна во всех случаях, когда создается новая методика анализа или изменяется уже существующая.

20.4. Стандартные операционные процедуры

Стандартные операционные процедуры (СОПы) — это подробное описание аналитических методов (или других лабораторных задач, таких как взвешивание и архивация документов).

Следуя такой инструкции, обученный и практически подготовленный человек должен быть способен выполнять описанную процедуру, поэтому без детальных подробностей описания процесса не обойтись. Лучше всего написать СОП человеку, который на самом деле делает соответствующий анализ, и затем попросить кого-нибудь еще критически прочесть написанное. После этого СОП утверждается и становится обязательным. Он может быть изменен в любое время, после чего только новая версия является правильной, а старый документ должен храниться в архиве.

СОПы для количественного анализа должны включать полное уравнение расчета измеряемой величины, а также пример, в котором показано, как производится расчет результата.

СОПы хранятся в лаборатории, для того чтобы иметь их под рукой в тех случаях, когда они необходимы.

20.5. Погрешность измерения¹

Результат количественного анализа содержит в себе не только измеряемую величину, но и погрешность ее измерения. Последнее означает ширину диапазона возможных колебаний значения измеряемой величины в пределах 68, 95 или 99,7 % доверительного интервала. Как известно, значения, полученные при повторных анализах, не являются одинаковыми, если принять во внимание достаточное количество значащих цифр. Для оценки таких отклонений необходима установленная процедура², потому что без значения погрешности измерения трудно решить, был ли превышен предел этого значения или две разные лаборатории все же способны достоверно выполнять анализы.

Погрешность измерений может быть определена различными методами. Один способ заключается в том, чтобы добавить стандартные погрешности ко всем параметрам, которые влияют на конечное значение (способ «снизу вверх»). Однако в случае хроматографических разделений трудно определить количество параметров, которые, взаимодействуя, вносят вклад в площадь

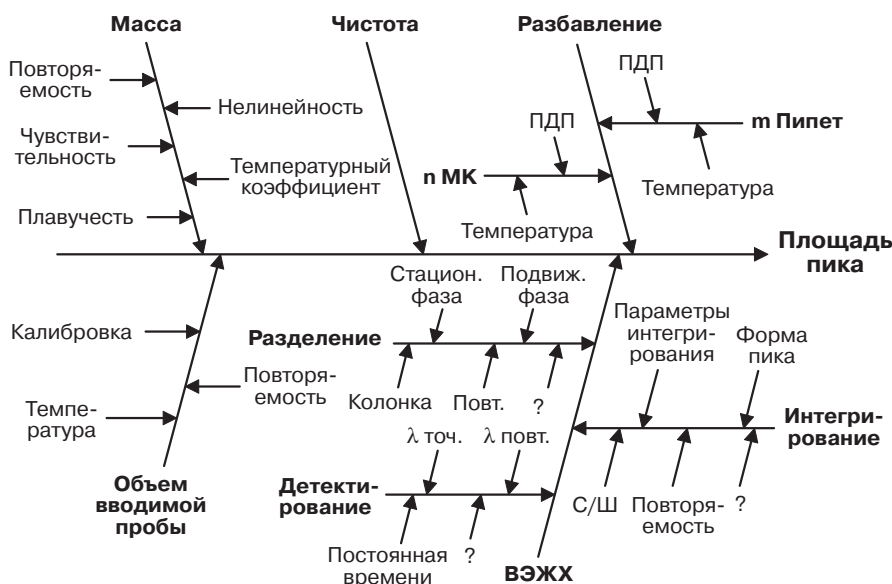


Рис. 20.1. Диаграмма Ишикавы для параметров, которые определяют площадь ВЭЖХ пика. «Масса» означает навеску образца или анализируемого вещества. Для его разбавления необходимо n мерных колб (МК) и m пипеток (пипет). Предельно допустимая погрешность (ПДП) волюмометрической операции — суммарный эффект неопределенности калибровки и повторяемости. Другие сокращения: λ — длина волны; точ. — точность; повт. — повторяемость; С/Ш — сигнал/шум

¹ V. R. Meyer, *J. Chromatogr. A*, **1158**, 15 (2007).

² S. L. R. Ellison, M. Rösslein and A. Williams (eds), *EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2nd edn, 2000, ISBN 0-948926-15-5. Свободный доступ на www.measurementuncertainty.org.

пика. Их количественная оценка будет еще более сложной¹. Рисунок 20.1 иллюстрирует проблему комплексного представления; некоторые знаки вопроса, стоящие отдельно (ВЭЖХ ответвление), указывают на то, что, вероятно, не все параметры известны. Поэтому напрямую подход «снизу вверх» не может быть использован в ВЭЖХ.

Можно взяться за проблему с другого конца и говорить о воспроизводимости процедуры, т. е. о межлабораторном стандартном отклонении s_R как о погрешности измерений (способ «сверху вниз»).

Если в случае совместных исследований одна и та же аналитическая процедура выполняется во многих лабораториях, можно предположить, что все возможные влияния будут учтены в межлабораторном стандартном отклонении, которое окончательно рассчитывается исходя из всех данных. Если не выполнялись межлабораторные испытания, то будет известно только собственное внутрилабораторное стандартное отклонения s_r . Его значение может быть слишком мало и, следовательно, слишком оптимистично, особенно когда необходимо сравнить собственные результаты с результатами из других лабораторий (поставщиками, потребителями, органами власти, конкурентами).

Погрешность измерений может быть также определена из валидационных данных².

Возможным решением для многих задач является многократная регистрация площадей пиков или их высот в образце сравнения (с контрольной диаграммой) и расчет стандартного отклонения этих величин. Это дает повторяемость Rep_{Ref} . Но это все же не погрешность измерения, потому что должны быть приняты во внимание погрешности определений чистоты образца сравнения и повторяемости извлечения (как, впрочем, строго говоря, и погрешности определения массы пробы и образца сравнения, значения которых очень малы, а взвешивание навески не столь точно).

Погрешность измерений концентрации анализируемого вещества в образце $u(c_{Sample})$ рассчитывается по формуле:

$$u(c_{Sample}) = c_{Sample} \sqrt{\left[\frac{u(Pur_{Ref})}{Pur_{Ref}} \right]^2 + \left[\frac{s(Rec_{Sample})}{Rec_{Sample}} \right]^2 + s_{rel}^2(Rep_{ref})},$$

где u означает стандартную погрешность, а s — стандартное отклонение.

Эта задача не ставится в данной книге потому, что вычисление некоторых стандартных погрешностей и стандартных отклонений является непростым делом.

20.6. Аттестация, тестирование прибора и тест на пригодность системы

Недостаточно использовать подходящие и валидированные аналитические методы. Надлежащее состояние приборов, т. е. их пригодность, является

¹ V. R. Meyer, *J. Chromatogr. Sci.*, **41**, 439 (2003).

² E. Compos Gimenez and D. Populaire, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, **28**, 3005 (2005).



необходимым условием для получения достоверных и повторяемых результатов. Новое оборудование должно пройти четыре шага аттестации.

- а) *Аттестация оборудования* (АО), т. е. определение требований и технических характеристик оборудования необходимо провести до его покупки. Этим занимается руководство лаборатории.
- б) *Установочная аттестация* (УА) происходит во время установки оборудования. Она включает в себя документацию на оборудование и проверку правильности его установки. За это отвечает техническая служба и руководство лаборатории.
- в) *Операционная аттестация* (ОА) происходит в процессе установки и является первым тестом, который показывает, что оборудование работает в соответствии с АО. Это задача для технической службы и сотрудников лаборатории.
- г) *Эксплуатационная аттестация* (ЭА)¹ производится после установки и представляет собой тест с типичными аналитическими задачами. ЭА повторяется регулярно и называется *тестом на пригодность системы* (см. ниже). Его выполняет персонал лаборатории.

После успешного завершения этих четырех этапов можно проводить анализы. Однако необходимо регулярно выполнять тестирование оборудования², по крайней мере один раз в год. Тест для ВЭЖХ системы описан подробно в главе 25.

Помимо этих аттестаций, лабораториям фармацевтической промышленности необходимо выполнять *тесты на пригодность системы* ТПС³. Любой метод должен использоваться только после успешных тестов ТПС. Как следствие, ТПС должны производиться регулярно, как правило ежедневно, и в любом случае в начале каждой новой серии анализов.

Процедура выполняется с использованием смеси, которая подобрана специально для данных образцов. Это вовсе не означает, что можно провести тест с любой смесью из чего угодно. По правилам фармакопеи США (АФ) требуется пять одинаковых анализов, которые позволяют получить следующие данные:

- а) калибровочная зависимость (наклон, пересечение с осью ординат);
- б) повторяемость площади пика(ов) или высоты пика(ов), которые рассчитываются как стандартное отклонение;
- в) повторяемость времени (времен) удерживания;
- г) размывание заднего фронта пика;
- д) разрешение (со следующим пиком или критической парой пиков);
- е) уровень шума базовой линии;
- ж) дрейф базовой линии.

Требования АФ для максимальных относительных стандартных отклонений для площади пика:

- а) менее 2 % для стандартных растворов,
- б) менее 15 % для биоаналитических образцов,
- в) менее 20 % для биоаналитических образцов с содержанием вещества около предела количественного определения.

¹ J. Crowther et al., *LC GC North Am.*, **26**, 464 (2008); L. Kaminski et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**, 557 (2010).

² G. Maldener, *Chromatographia*, **28**, 85 (1989).

³ J. W. Dolan, *LC GC Eur.*, **17**, 328 (2004) или *LC GC North Am.*, **22**, 430 (2004).

20.7. Задача определения качества

Аналитическая лаборатория (или компания в целом) может стремиться к получению сертификата ISO или EN-аккредитации. Сертификация в соответствии с ISO 9001¹ относится только к формальным и техническим процессам, но не к вопросам качества. Для учреждения, которое продает товары или услуги, аккредитация проходит в соответствии с EN17025². Нормы требований следующие: «Квалифицированный персонал может проводить строго определенные измерения в соответствии с валидированными методами и на протестированном измерительном оборудовании. Все процедуры четко регламентированы и гарантируется надлежащая документация».

Для аккредитации нужна длительная и напряженная подготовка. Она подтверждается только после тщательного осмотра сторонними экспертами, которые посещают лаборатории или компанию в течение нескольких дней. Список требований, которые должны соблюдаться, длинен и подробен.

Даже без сертификации или аккредитации настоятельно рекомендуется выполнять ряд действий по контролю качества (они являются обязательными для аккредитации):

- а) использовать реагенты только хорошо известного качества;
- б) отмечать время вскрытия и сроки годности на бутылках и упаковках с реагентами;
- в) определять характеристики колонки;
- г) тестировать колонку;
- д) повторять тестирование колонки через определенные интервалы времени;
- е) вести журналы использования колонок;
- ж) определять характеристики оборудования;
- з) тестировать оборудование;
- и) повторять тестирование оборудования через определенные интервалы времени;
- к) вести журналы работы оборудования;
- л) тестировать систему на пригодность (возможно, с упрощенным протоколом);
- м) использовать контрольные диаграммы³, отображающие тенденции и отклонения (рис. 20.2);
- н) участвовать в межлабораторных испытаниях⁴, чтобы получить отзыв о компетентности лаборатории.

¹ ISO 9001:2000, *Quality Management Systems — Requirements*, International Organization for Standardization, Geneva, 2000.

² EN ISO/IEC 17025:2005, *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, International Organization for Standardization, Geneva 2005.

³ E. Mullins, *Analyst*, **119**, 369 (1994) и **124**, 433 (1999).

⁴ J. Vial and A. Jardy, *Chromatographia Suppl.*, **53**, S-141 (2001).

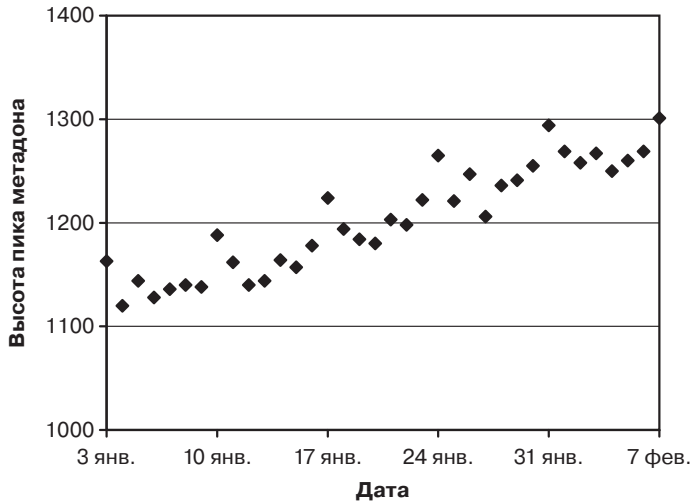


Рис. 20.2. Простая контрольная диаграмма. На рисунке изображен ежедневный контрольный анализ. В данном случае это изменение высоты пика стандарта метадона. Диаграмма иллюстрирует два важнейших факта: первый анализ, который сделан в начале недели, дает заметно большую высоту пика, чем последующие; кроме того, наблюдается тенденция к увеличению высоты пика. Причины этого должны быть найдены и приняты меры для получения в дальнейшем стабильных результатов

Задача 39

Вы становитесь новым менеджером компании по качеству. Пока никаких официальных мероприятий по соблюдению качества нет, а денег на это выделено немного. Вы решили реализовать пять мер из нижеприведенного списка. С чего начать? Каковы ваши цели на более длительный срок?

- а) Соответствующее программное обеспечение делает невозможным изменение электронных данных без соответствующих полномочий.
- б) Создание графиков контроля.
- в) Дата и подписи на каждом письменном или электронном документе.
- г) Указание даты вскрытия и окончание срока годности указываются на этикетках химических веществ.
- д) Заведение журналов оборудования.
- е) Проведение семинаров и обсуждений, для того чтобы убедить персонал в правильности новых мероприятий.
- ж) Организация испытаний на пригодность системы.
- з) Стремление к сертификации или аккредитации.
- и) Успешное участие в межлабораторных испытаниях.
- к) Создание письменно задокументированных стандартных операционных процедур.

Решение

Единого правильного ответа не существует. Однако ваши усилия будут тщетны, если вы не убедите персонал в правильности принимаемых мер. Другими быстро проводимыми бесплатными или недорогими мерами являются: проставление даты и подписи на документах, контроль даты (срока годности) на химических веществах, создание графиков контроля и защита электронных данных. Сертификация или аккредитация — это долгосрочные цели с временными рамками от одного до трех лет.

ГЛАВА 21

ПРЕПАРАТИВНАЯ ВЭЖХ¹

21.1. Задачи

Целью препаративной хроматографии является очистка и выделение веществ с целью их дальнейшего использования. В зависимости от поставленных задач количества выделяемых веществ могут варьироваться в широком диапазоне. Так, для регистрации УФ-спектра вещества достаточно нескольких микрограмм, что соответствует одному аналитическому пику. Для ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР и масс-спектрометрии требуется не менее 10 мг чистого вещества², а для определения эмпирической формулы методом элементного анализа необходимо 5 мг вещества. Для исследования реакционной способности или последующего синтеза производных требуется 10–100 мг вещества. Такие количества вещества почти всегда можно выделить на аналитическом оборудовании, хотя процесс этот зачастую отнимает много времени и иногда называется масштабированием (т. е. увеличение загрузки до ранее незапланированной массы)³. С помощью классической колоночной хроматографии можно выделить 1–100 г продукта, и именно это с давних пор было важнейшей областью использования хроматографии. В то же время специальное препаративное оборудование для ВЭЖХ позволяет существенно сократить и, кроме того, оптимизировать процесс. На промышленных предприятиях используют колонки диаметром 1,6 м и производительностью от 1 до 3 кг/ч.

В этой главе описаны методы разделения веществ массой от 10 мг до нескольких грамм. Если необходимо выделить больше или меньше этого количества, то можно также воспользоваться этим материалом, поскольку в этих процессах нет существенной разницы.

Внимание: любое аналитическое разделение можно масштабировать до препаративного!

¹ G. Guiochon, A. Felinger, D. G. Shiraz and A. M. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Elsevier Academic Press, New York, 2nd edn, 2006; H. Schmidt-Traub, ed., *Preparative Chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005; G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **965**, 129 (2002).

² Чувствительность современных детекторов гораздо выше — для этих целей достаточно нанограммов вещества. — *Прим. пер.*

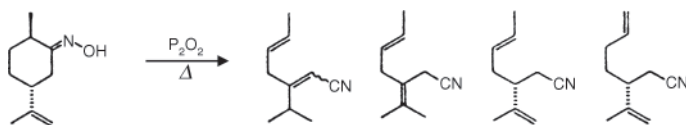
³ Необходимо различать масштабирование и работу в «перегруженном» состоянии. Масштабирование предполагает еще и увеличение геометрических размеров колонки. Например, с 4,6 до 10 или 100 мм. — *Прим. пер.*

21.2. Препаративная ВЭЖХ на практике¹

Как правило, аналитическая хроматография является отправной точкой препаративного разделения. С ее помощью необходимо определить подходящие условия для изократического² разделения образца с хорошим разрешением:

- а) в препаративной хроматографии не рекомендуется использовать градиенты, поскольку они существенно удорожают процесс³. Лучше до разделения провести пробоподготовку;
- б) чем лучше разрешение на аналитической колонке, тем больше вещества можно загрузить на препаративную колонку.

На рис. 21.1 изображена аналитическая хроматограмма продуктов реакции термического разложения оксима *транс*-дигидрокарвона.



Структуры продуктов были неизвестны. Кроме того, не было уверенности в том, что каждый отдельный пик соответствует только одному веществу.

Оптимизировав аналитическое разделение, переходят на высокоэффективные препаративные колонки с частицами с 5, 7 или 10 мкм (для простых, не требующих более 100 теоретических тарелок разделений лучше всего подходят колонки, набитые крупнодисперсным 40-мкм сорбентом). Такие колонки можно приобрести у различных производителей. Чтобы разделить 10–100 мг образца, берут колонку с внутренним диаметром 10 мм. Если масса образца колеблется от 100 мг до 1 г, то подойдут колонки с внутренним диаметром 21,5 мм (дюймовые). Использование колонок, упакованных одинаковым сорбентом, облегчит перенос аналитических условий на препаративные.

Колонки большего диаметра должны устанавливаться в хроматографическую систему, снабженную насосом, обеспечивающим высокую скорость потока для сохранения одинаковой линейной скорости подвижной фазы и, следовательно, времен удерживания, которые зависят от объемной скорости потока. Так, например, для сохранения одинаковой линейной скорости для колонок диаметром 4 и 10 мм объемная скорость потока для 10-мм колонки должна быть в 6,25 раз больше!

Детектор должен быть с низкой чувствительностью. Самым оптимальным является рефрактометрический детектор (если необходимо — с препаративной ячейкой) или УФ-детектор с длиной оптического пути 0,1–0,5 мм. Минимальная

¹ V. R. Meyer, *J. Chromatog.*, **316**, 113 (1984); B. Porsch, *J. Chromatogr. A*, **658**, 179 (1994); P. Renold, E. Madero and T. Maetzke, *J. Chromatogr. A*, **908**, 143 (2001); P. López-Soto-Yarritu *et al.*, *LCGCEur.*, **18**, 669 (2005).

² Либо градиентного. — *Прим. пер.*

³ Это не совсем так или совсем не так. Самое дорогое в препаративной хроматографии — это не очищенное до нужной степени вещество. Если градиентное разделение дает нужный результат, а изократическое нет, то необходимо использовать возможности градиента. В общем же случае все зависит от конкретного состава смеси и от природы образца. — *Прим. пер.*

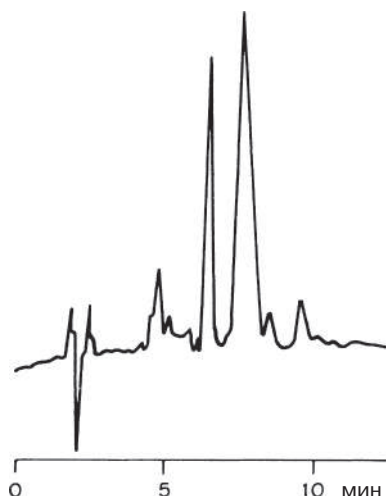


Рис. 21.1. Аналитическое разделение реакционной массы. Условия: образец растворен в 20 мкл элюента, колонка 25 см×3,2 мм, сорбент LiChrosorb Si 60, 5 мкм, подвижная фаза пентан — диэтиловый эфир (95:5)¹, скорость потока 1 мл/мин, рефрактометрический детектор

длина пути наблюдается при использовании пленочного детектора, в котором элюат течет по наклонной стеклянной пластине².

В образце не должны содержаться сильно удерживаемые вещества. Выяснить это можно с помощью тонкослойной хроматографии (на старте не должно быть никаких следов). Когда дело касается реакционных смесей или образцов природного происхождения, то настоятельно рекомендуется предварительно очищать их адсорбционной фильтрацией или, если требуется, колоночной хроматографией. Очень важно использовать предколонку, защищающую от примесей и продуктов распада, которые не удалось полностью удалить ранее. Потерь можно избежать, не допуская полного наполнения петли (см. раздел 4.6).

Компоненты подвижной фазы должны быть очень чистыми и летучими. Это позволяет после хроматографии легко выделить любой компонент образца в чистом виде (см. задачу 43 в разделе 21.4). К летучим буферным реагентам относятся уксусная кислота, трифторуксусная кислота, муравьиная кислота, аммиак, гидрокарбонат аммония, триэтиламин, триметиламин, этаноламин, пиридин и др. (также см. раздел 5.4).

На рис. 21.2 изображена хроматограмма описанного выше препаративного разделения реакционной смеси, в ходе которого выделили четыре вещества. Их структуры установили с помощью ЯМР. Некоторые пики на хроматограмме неправильной формы, что связано с перегрузкой колонки.

Во время оптимизации рутинных разделений или разделений в промышленных масштабах, помимо чистоты выделяемого вещества, следует учитывать экономические затраты, к которым относится стоимость подвижной и неподвижной фаз, а также затраты всего процесса за единицу времени³.

¹ Поскольку выделяемые вещества относительно летучи, то для удобства их выделения температура кипения элюента должна быть низкой, в случае нелетучих продуктов следует использовать гексан-*mpem*-бутилметиловый эфир.

² T. Leutert and E. von Arx, *J. Chromatogr.*, **292**, 333 (1984).

³ M. Kaminski, B. Sledzinska and J. Klawiter, *J. Chromatogr.*, **367**, 45 (1986); R. M. Nicoud and H. Colin, *LC GC Int.*, **3**(2), 28 (1990).

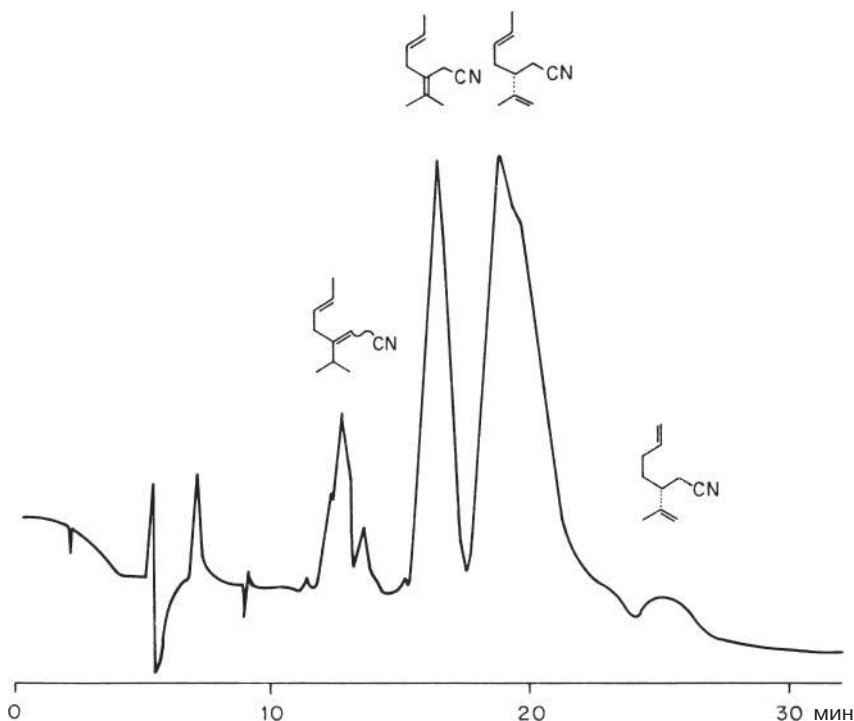


Рис. 21.2. Препаративное разделение реакционной смеси. Условия: 1 мл раствора содержит 250 мг разделяемой смеси, предколонка 5 см × 4,5 мм, упакованная сухим способом силикагелем (40 мкм), колонка 25 см × 21,5 мм, сорбент силикагель, 7 мкм, элюент пентан — диэтиловый эфир (95:5), скорость потока 14 мл/мин, рефрактометрический детектор

Задача 40

Необходимо выделить вещество в чистом виде методом препаративной ВЭЖХ. Процесс разделения осуществлять в автоматическом режиме, начиная от инъекции до сбора фракций. Могут быть использованы следующие хроматографические системы и колонки:

- аналитическая колонка 4,6 мм × 25 см, 5-мкм сорбент. Количество наносимого интересующего вещества 1,2 мг на загрузку, разрешение до базовой линии. Скорость потока 2 мл/мин, время разделения — 8 мин;
- препаративная колонка 22 мм × 25 см, 5-мкм сорбент. Количество вещества 120 мг, разрешение до базовой линии. Скорость потока 14 мл/мин, время разделения — 30 мин;
- препаративная колонка 22 мм × 25 см, 40-мкм сорбент. Количество вещества 120 мг, в чистом виде можно выделить всего лишь 80 %, поскольку разделение пиков неполное. Скорость потока 14 мл/мин, время разделения 37 мин.

Определить общую производительность (соотношение массы за единицу времени) чистого вещества в трех вариантах.

Определить производственные затраты (евро/г) этих вариантов (не учитывая амортизацию, затраты на приобретение, которые всегда высоки). Стоимость элюента 24 евро за литр, однако 90 % элюента после регенерации можно использовать заново, стоимость регенерации 1 л элюента 5 евро. Во всех вариантах после 200 разделений требуется переупаковка колонки. Стоимость сорбента: (а) 60 евро, (б) 1400 евро, (в) 110 евро.

Решение

Выход: (а) 9 мг/ч, (б) 240 мг/ч, (в) 156 мг/ч. Стоимость: (а) 340 евро/г, (б) 83 евро/г, (в) 43 евро/г.

21.3. Перегрузка

В препаративной хроматографии колонки практически всегда работают при перегрузке. Можно выделить три вида перегрузки:

- а) перегрузка по объему;
- б) перегрузка по массе (ее еще называют перегрузкой по концентрации);
- в) перегрузка детектора.

Эффекты от некоторых видов перегрузок показаны на рис. 21.3.

На *аналитической хроматограмме* видно, что объем анализируемого образца настолько мал, что не влияет на ширину пиков. Более того, здесь вообще нет перегрузки, поскольку и масса образца слишком мала¹. В разделе 19.2 даны рекомендации, каким может быть максимально допустимый объем. Чтобы не допустить перегрузки по массе, следует обратиться к разделу 2.7, в котором описано, какой должна быть максимально допустимая масса.

При *перегрузке по объему* объем вводимого образца настолько велик, что влияет на ширину пика (большой объем образца при малой концентрации вещества в нем позволяет избежать перегрузки по массе). Как можно заметить на рис. 21.3, ширина пика на полувысоте x одинакова как на входе в колонку, так и на выходе из нее. При этом не изменилась и максимальная концентрация в максимуме пика (в том случае, когда при высоких значениях k вещество не очень разбавилось). Очевидно, что при перегрузке по объему пики становятся *прямоугольными*.

В принципе перегрузку по объему можно увеличивать до тех пор, пока пики на хроматограмме не начнут соприкасаться друг с другом. Максимальный объем загрузки V_L можно определить с помощью аналитической хроматограммы²:

$$V_L = V_0 \left[(\alpha - 1)k_A - \frac{2}{\sqrt{N}}(2 + k_A + \alpha k_A) \right],$$

где V_0 — мертвый объем (объемная скорость потока элюента, умноженная на время выхода неудерживаемого соединения), α — коэффициент селективности для

¹ Разделение происходит в линейном диапазоне изотермы адсорбции.

² Это уравнение справедливо только в тех случаях, когда растворитель, в котором растворен образец, и элюент обладают одинаковой элюирующей способностью. Если же растворитель значительно слабее элюента, то объем загрузки можно еще увеличить (см. раздел 19.2).

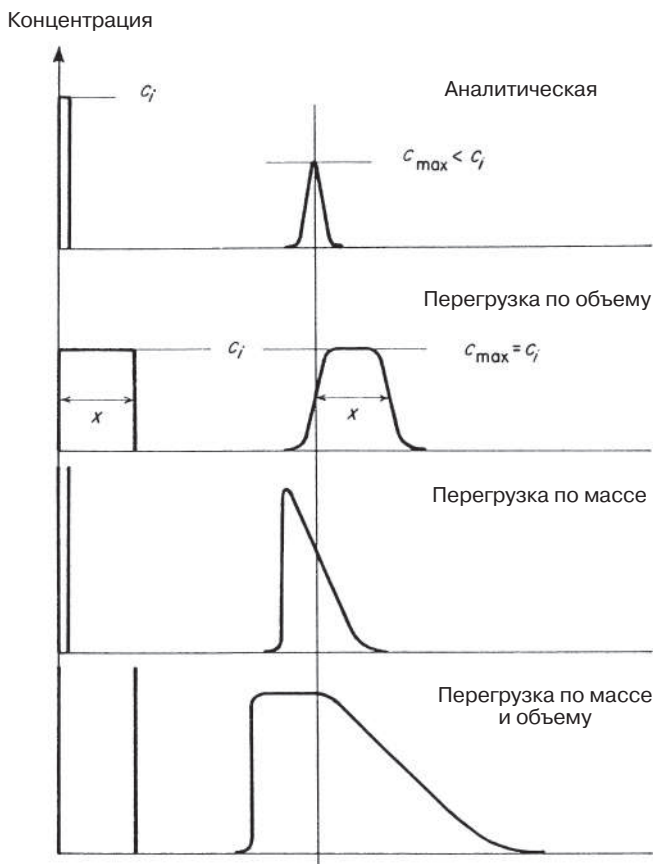


Рис. 21.3. Некоторые виды перегрузок в ВЭЖХ

разделяемых пиков, k_A — коэффициент удерживания первого интересующего пика, N — количество теоретических тарелок. На колонку можно нанести образец объемом V_L только в том случае, если не будет перегрузки по массе, т.е. раствор образца должен быть достаточно разбавлен. В остальных случаях объем образца должен быть меньше.

Задача 41

В разбавленном растворе содержится вещество А, которое необходимо выделить методом препаративной ВЭЖХ. Коэффициент селективности вещества А по отношению к ближайшему пику составляет 1,5, коэффициент удерживания равен 4. Количество теоретических тарелок используемой аналитической колонки 6400, а мертвый объем — 2 мл. Определить максимально допустимый наносимый объем образца, при котором пик А будет непосредственно соприкасаться с ближайшим соседним пиком.



Решение

$$V_L = 2 \left\{ (1,5 - 1)4 - \frac{2}{\sqrt{6400}} [2 + 4 + (1,5 \times 4)] \right\} = 3,4 \text{ мл.}$$

Если масса образца (которая определяется как произведение объема образца на концентрацию) больше определенного значения, то локальная концентрация образца внутри колонки будет настолько велика, что приведет к изменению нормального равновесия в колонке. Это и называется *перегрузкой по массе*. Пики на хроматограмме приобретают *треугольную* форму. В большинстве случаев размывание заднего фронта пика сопровождается уменьшением времени удерживания. Это видно на рис. 21.3 и 2.23. Иногда, однако, перегрузка по массе проявляется в виде размывания переднего фронта пика и увеличения времени удерживания.

Хроматографист, занимающийся препаративной хроматографией, как правило, хочет выделить за единицу времени как можно больше чистого вещества. Поэтому и возникает необходимость работать в условиях перегрузки¹. Если растворы образцов разбавлены, то преимущественно будет наблюдаться перегрузка по объему, если же растворы концентрированные — перегрузка по массе. Зачастую сталкиваются с двумя перегрузками одновременно. Пики при этом становятся усеченными (см. нижнюю хроматограмму на рис. 21.3, при увеличении удерживания плато сглаживается, и пики приобретают треугольную форму). Максимально допустимый объем наносимого концентрированного раствора определяют эмпирически: объем образца увеличивают до тех пор, пока пики на хроматограмме не начинают соприкасаться друг с другом. Разбавленные образцы не используют.

Не рекомендуется растворять образец в более сильном растворителе, чем элюент. Поскольку в препаративной хроматографии, как правило, наносят большие объемы разделяемой смеси, то растворитель образца будет нарушать равновесие колонки, и разделения могут стать невоспроизводимыми. Вместе с тем надо подбирать элюент таким образом, чтобы он хорошо растворял образец, иначе колонка может забиться.

Перегрузка детектора происходит в том случае, когда сигнал превышает динамический диапазон детектора, при этом он становится прямоугольным. Возникает ложное ощущение перегрузки колонки. В разделе 21.2 уже упоминалось, что в препаративной хроматографии лучше использовать детекторы с низкой чувствительностью. Что касается УФ-детекторов, то это должно достигаться уменьшением длины оптического пути.

Рефрактометрический детектор до некоторой степени может гарантировать сбор чистых фракций благодаря его неселективности, в отличие от УФ-детектора, который не увидит пики веществ, не поглощающих в УФ-диапазоне и способных частично перекрываться с пиками поглощающих соединений. В таких случаях сложно обеспечить сбор чистых фракций.

¹ G. Cretier and J. L. Rocca, *Chromatographia*, **21**, 143 (1986); A. F. Mann, *Int. Biochem. Lab.*, **4**(2), 28 (1986); J. H. Knox and H. M. Pyper, *J. Chromatogr.*, **363**, 1 (1986); G. Guiochon and H. Colin, *Chromatogr. Forum*, **1**, 21 (1988); G. B. Cox and L. R. Snyder, *LC GC Int.*, **1**(6) (1988); S. Golshan-Shirazi and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, **61**, 1368 (1989).

21.4. Сбор фракций

Внутренний объем капилляров между детектором и коллектором фракций должен соотноситься со скоростью потока подвижной фазы и быть минимальным, насколько это возможно¹.

Задача 42

Длина капилляров с внутренним диаметром 0,3 мм равна 20 см. Для того чтобы точно собирать фракции, с момента регистрации сигнала и выхода образца должно проходить не более 1 сек. Определить минимально допустимую скорость потока подвижной фазы.

Решение

$$\text{Объем капилляра} = \frac{d^2 \pi}{4} l = \frac{0,3 \cdot 0,3 \cdot \pi \cdot 200}{4} = 14 \text{ мм}^3.$$

$$\text{Минимальная скорость потока} = 14 \text{ мм}^3 \cdot \text{сек}^{-1} = 840 \text{ мм}^3 \cdot \text{мин}^{-1} = 0,84 \text{ мл/мин}.$$

Когда препаративные разделения проводят периодически, фракции можно собирать вручную на выходе из детектора в колбы или, если используется коллектор фракций, проводить сбор фракций вручную по сигналу на мониторе. При необходимости постоянно выделять большие количества вещества лучше использовать полностью автоматизированную систему. Сбор фракций программируют по двум критериям: время и сигнал. Таким образом, каждый пик возможно собрать в отдельную колбу, не смешивая с другими. Пока с колонки не элюируются примеси или любые другие пики, элюат следует направлять обратно в емкость с подвижной фазой. Следующее автоматическое разделение начинают по окончании предыдущего разделения².

Когда пики плохо разрешены (рис. 21.4), выход собранных чистых фракций снижается. В такой ситуации отдельно собирают фракцию, содержащую оба компонента, а затем, если есть необходимость, ее повторно очищают (см. раздел 21.5).

На рисунках раздела 2.4 изображена более подробная информация о чистоте плохо разрешенных пиков. Однако не рекомендуется использовать эти рисунки в качестве руководства для разделений с сильной перегрузкой по массе, поскольку пики в этом случае, помимо того, что имеют треугольную форму, еще и оказывают влияние друг на друга. Пики в зависимости от соотношения могут

¹ При этом надо учитывать то обстоятельство, что при очень малом объеме капилляра (а это автоматически означает малый внутренний диаметр капилляра) возрастет давление на этом участке. Последнее может негативно отразиться, к примеру, на ячейке детектора. — *Прим. пер.*

² Далеко не всегда можно элюат направлять обратно в емкость с подвижной фазой. Если вы, например, используете УФ-детектор, а примеси не поглощают в выбранном вами диапазоне длин волн, такая экономия элюата может вам дорого обойтись. — *Прим. пер.*

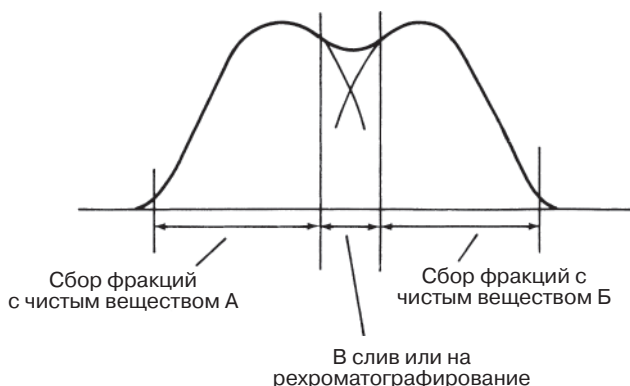


Рис. 21.4. Препаративное разделение двух пиков с низким разрешением

так сильно пересекаться друг с другом, что второй пик, в отличие от первого, нельзя будет выделить в чистом виде¹.

Ранее уже упоминалось необходимое условие препаративной хроматографии — высокая степень чистоты подвижной фазы. Если его не соблюдать, то после удаления растворителя примеси из элюента останутся в собранных чистых фракциях.

Задача 43

Методом препаративной ВЭЖХ можно выделить продукт чистотой 99,5 % по отношению к сопутствующим примесям. Его концентрация в элюате составляет 5 мг/мл. Количество нелетучих примесей в подвижной фазе равно 0,002 % (масс./об). Определить чистоту продукта после упаривания.

Решение

1 мл элюата содержит 5 мг вещества чистотой 99,5 %, т. е. 4,975 мг целевого продукта, 0,025 мг сопутствующих примесей и 0,020 мг примесей элюента. Суммарно получается 0,045 мг примесей и 4,975 мг основного вещества. Чистота продукта после упаривания составит 99,1 %.

21.5. Рехроматография

С увеличением массы и объема образца отдельные пики с низким разрешением вовсе перестают отделяться друг от друга. В таких случаях разрешение можно повысить, если элюат с неразделившейся смесью еще раз пропустить через колонку. Сделать это можно двумя способами²:

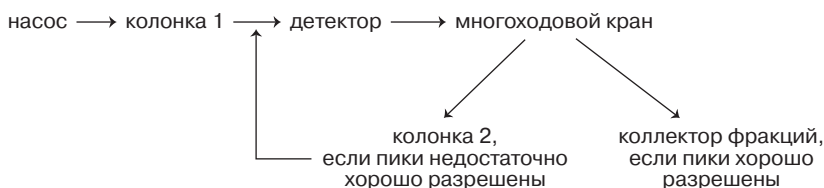
- а) элюат, вытекая из колонки, проходит через детектор и возвращается обратно в колонку. При этом объем между детектором и головой насоса

¹ S. Ghodbane and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, **444**, 275 (1988).

² На самом деле этих способов больше, но здесь указаны два самых простых. — *Прим. пер.*

должен быть как можно меньше, а сам насос безимпульсным (так как демпфер пульсаций создает слишком большой внеколоночный объем)¹. Для этого способа требуется относительно большая колонка (например, колонка 250×2 мм не подходит). Однако, несмотря на наличие всех этих условий, в каждом цикле наблюдается достаточно сильное размывание пика. В зависимости от поставленной задачи, можно проводить до 10 циклов;

- б) элюат протекает через две колонки, расположенные в определенном порядке, по схеме:



Через две колонки поочередно можно провести до 20 циклов. К достоинствам этого способа относят небольшой внеколоночный объем, а объем насоса подойдет любой. При этом ячейка детектора должна выдерживать высокие давления.

21.6. Вытеснительная хроматография²

Даже в условиях перегрузки соотношение массы образца и требуемого для разделения количества сорбента низкое и неэкономное. В большинстве случаев оно не превышает 10 мг/г. В препаративной хроматографии существует абсолютно другой подход — вытеснительная хроматография (рис. 21.5). По этой методике на колонку наносят сравнительно большое количество вещества. Поскольку компоненты образца проявляют разные аффинные свойства по отношению к сорбенту, то в процессе элюции они вытесняют друг друга из «адсорбционных» (в широком смысле) центров сорбента. Если эффективность колонки достаточно высока, то сразу же можно собирать чистые фракции.

Чтобы увидеть вытеснение в действии, необходимо на колонку нанести сначала образец, а затем вещество, аффинные свойства которого выше, чем у образца³. Это так называемый вытеснитель. Его оптимальное количество определяется эмпирически. В качестве вытеснителя для силикагеля наиболее подходящими могут быть четвертичные амины (если в состав образца не входят кислоты), для обращенной фазы — спирты. После каждого разделения колонку необходимо регенерировать.

¹ Демпферы давно перестали применять, и для подавления пульсаций теперь используют другие, более современные электронные и механические средства. — *Прим. пер.*

² J. Frenz and C. Horváth, in *HPLC Advances and Perspectives*, vol. 5, C. Horváth, ed., Academic Press, New York, 1988, pp. 211–314; J. Frenz, *LC GC Int.*, 5 (12), 18 (1992).

³ Такой способ есть, но он достаточно редко применяется на практике. — *Прим. пер.*

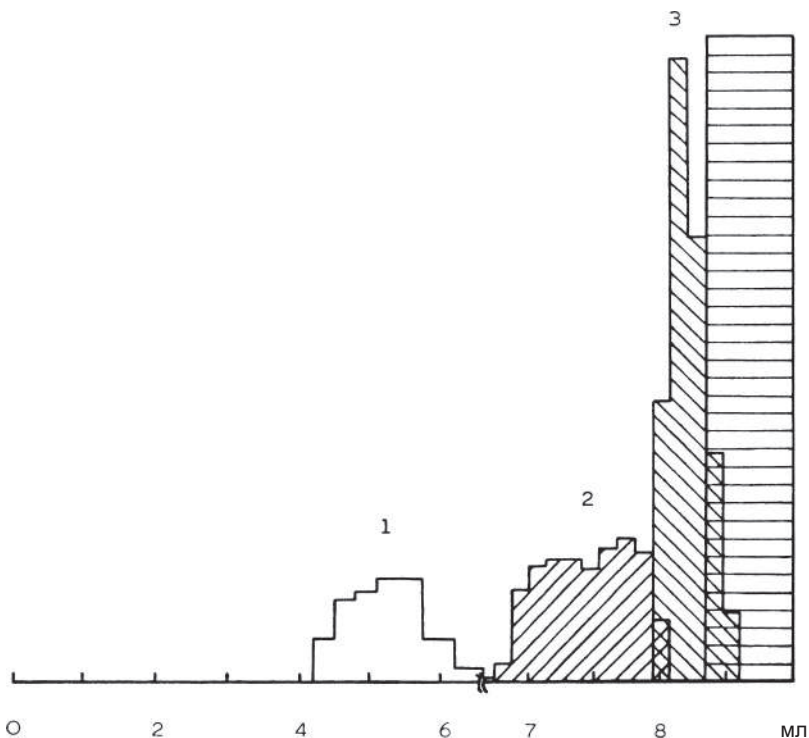


Рис. 21.5. Разделение пептидов методом вытеснительной хроматографии (печатается с разрешения G. Subramanian, M. W. Phillips and S. M. Cramer, *J. Chromatogr.*, **439**, 431 (1988)). Условия: колонка 25 см × 4,6 мм, сорбент Zorbax ODS 5 мкм, подвижная фаза 50 мМ фосфатный буфер, pH 2,2 — метанол (60:40), скорость потока 1 мл/мин, температура 45 °С. Пики: 1 — 9,6 мг *N*-бензоил-*L*-аргинин, 2 — 14 мг *N*-карбоксибензоксид-*L*-аланил-*L*-глицил-*L*-глицин, 3 — 15 мг *N*-карбоксибензоксид-*L*-аланил-*L*-аланин. Вытеснитель (горизонтально заштрихованная площадь): 30 мг/мл 2-(2-бутоксид-этоксид)этанол в элюенте. Состав 150 мкл фракций анализировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ

В процессе масштабирования аналитической методики невозможно подобрать оптимальные условия — это недостаток вытеснительной хроматографии¹. Тем не менее после более или менее продолжительной, но успешной оптимизации в условиях вытеснительной хроматографии ни один другой метод не даст такого высокого выхода за единицу времени при малом расходе подвижной фазы.

¹ Аналитическая ВЭЖХ происходит в линейной части изотермы адсорбции, а вытеснительная хроматография — в нелинейной.

ГЛАВА 22

РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ¹

22.1. Введение

Энантиомерами называют пару стереоизомеров, представляющих собой зеркальные отражения друг друга, не совмещаемые в пространстве. Такие молекулы обладают одинаковыми физическими и химическими свойствами, за исключением способности вращать плоскость поляризации линейно-поляризованного света. Их нельзя разделить никакими из описанных выше методов.

Чтобы разделить энантиомеры хроматографически, в системе что-то должно быть асимметричным, т.е. есть хиральным. Этого можно достичь разными способами:

- а) подвижная фаза — хиральная, сорбент — ахиральный (т.е. обычный сорбент для ВЭЖХ). Для осуществления разделения необходимо добавить лишь небольшое количество хирального соединения к подвижной фазе;
- б) твердый носитель с нанесенной хиральной жидкой стационарной фазой, подвижная фаза — ахиральная;
- в) твердая хиральная стационарная фаза, а подвижная фаза ахиральная. Этот метод легок в применении, но сорбент достаточно дорог.

Во всех описанных выше способах разделения между молекулами образца и хиральными участками сорбента или элюента образуются диастереомерные комплексы, которые перемещаются по колонке с разной скоростью. Например, некоторые аминокислоты образуют диастереомерные комплексы с ионами меди хорошо известной структуры: молекулы образца могут координационно связываться с таким комплексом (рис. 22.1). Эти комплексы либо привиты к поверхности силикагеля (рис. 22.1), либо их добавляют в подвижную фазу².

Энантиомеры также можно разделять традиционными хроматографическими методами, предварительно превратив их в диастереомеры. Для этого их дериватизируют хиральными соединениями. Такой непрямой метод разделения энантиомеров описан в разделе 22.5.

¹ G. Gübitz and M. G. Schmid, eds., *Chiral Separations: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, 2004; G. Subramanian, ed., *Chiral Separation Techniques*, Wiley-VCH, Weinheim, 3rd edn, 2007.

² Прививают аминокислоты (например, пролин, гидроксипролин), а ионы металла добавляют в подвижную фазу. Способ похож на ион-парную хроматографию. — *Прим. пер.*

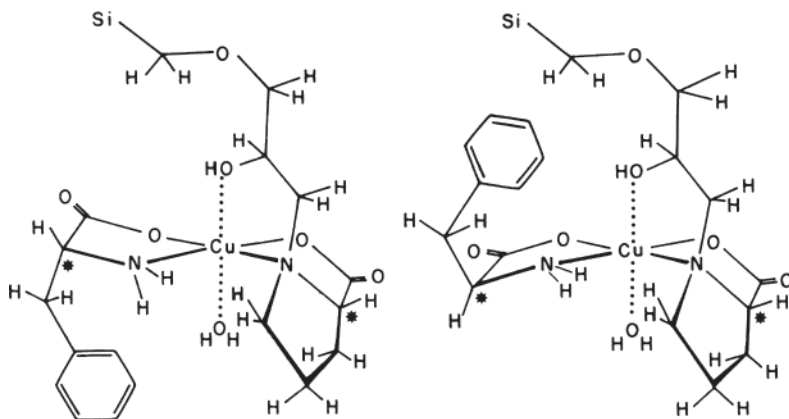


Рис. 22.1. Модель диастереомерных комплексов (левовращающего) D- и (правовращающего) L-фенилаланина с медь-содержащим L-пролином, привитым на силикагеле (печатается с разрешения из G. Gübitz, W. Jellenz and W. Santi, *J. Chromatogr.*, **203**, 377 (1981))

Коэффициент селективности α — важный параметр, характеризующий хиральную систему разделения:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0},$$

где $k_2 > k_1$. В разделе 2.5 уже упоминалось: число теоретических тарелок, необходимое для специфического разделения пары пиков, уменьшается при увеличении коэффициента селективности. В отличие от капиллярной газовой хроматографии, в ВЭЖХ затруднительно работать с α менее 1,05. Однако и слишком высокие значения коэффициента селективности ($\alpha > 3$) на практике нежелательны, поскольку соответствующие пары пиков будут очень далеко находиться друг от друга, и их сложно будет идентифицировать в качестве энантиомеров.

Если позволяют условия (высокая концентрация аналита и удельное вращение), в качестве детектора применяют поляриметр¹. Кроме того, для детектирования можно использовать круговой дихроизм² и даже получать КД-хроматограммы. Определить абсолютную конфигурацию можно различными методами³.

Разделение энантиомеров имеет большое значение в фармацевтической и клинической областях, поскольку многие лекарства приготовлены из субстанций, в которых действующее вещество представляет собой асимметричную молекулу. Энантиомеры зачастую по-разному действуют на организм и различаются по фармакокинетическим свойствам.

¹ D.R. Bobbitt and S.W. Linder, *Trends Anal. Chem.*, **20**, 111 (2001); G.W. Yanik, in: Subramanian (первое примечание к этой главе), p. 561.

² Намного более чувствительный метод, чем поляриметрия. — *Прим. пер.*

³ C. Roussellet *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **1037**, 311 (2004).

22.2. Хиральные подвижные фазы¹

Хиральный реагент добавляют в подвижную фазу с целью образования комплекса (в строгом понимании), ионной пары или другого соединения с энантиомерами образца. В этом случае есть шанс, что коэффициенты распределения между подвижной и неподвижной фазами образующихся диастереомерных комплексов будут разными и они разделятся на обычной ВЭЖХ-колонке. В качестве примера можно привести разделение энантиомеров *N*-(1-фенилэтил)фталевой кислоты, где хинин используют как хиральный ион-парный агент (рис. 22.2).

Достоинством этого метода является большое количество коммерчески доступных хиральных реагентов, из которых пользователь может выбрать наиболее подходящие для разделения. К счастью, не все оптически активные реагенты дороги, и для предварительных тестов используется лишь небольшое их количество. В хиральной хроматографии нет ограничений в выборе сорбента, а опыт в ахиральной хроматографии, без сомнений, поможет правильно выбрать элюент (главное — определиться, какую подвижную фазу использовать: водную или безводную). Не является необходимым использование оптически чистого хирального реагента² (но не рацемата, поскольку с рацемическим



Рис. 22.2. Разделение энантиомеров *N*-(1-фенилэтил)фталевой кислоты с хиральным ион-парным реагентом (печатается с разрешения из С. Pettersson, *J. Chromatogr.*, **316**, 553 (1984)). Условия: сорбент LiChrosorb SI 100, 5 мкм, подвижная фаза хлористый метилен — бутан-1,2-диол (99:1), содержащий 0,35 мМ хинина и 0,35 мМ уксусной кислоты; УФ-детектор. Отрицательный пик на 19 минуте — системный пик

¹ B.J. Clark, in: *A Practical Approach to Chiral Separation by Liquid Chromatography*, G. Subramanian, ed., VCH, Weinheim, 1994, p. 311–328.

² C. Pettersson, A. Karlsson and A. Gioeli, *J. Chromatogr.*, **407**, 217 (1987).



реагентом не будет никакого разделения!). Лучше подобрать такой хиральный реагент, который позволит элюировать компоненты образца в желаемом порядке (минорный компонент должен выходить первым).

Разделение энантиомеров с помощью хиральной подвижной фазы основано на равновесии, которое может сдвигаться, поскольку зависит от концентрации, температуры и pH. Для оптимизации разделения необходимо варьировать эти параметры. Если система слишком чувствительна к одному из параметров, тогда необходимо определить его оптимальный уровень и сохранять строго постоянным.

Один из недостатков метода — после разделения энантиомер представляет собой диастереомерный комплекс, который может и не диссоциировать. В таком случае препаративное разделение невозможно.

22.3. Твердый носитель, покрытый хиральной жидкой неподвижной фазой

Хиральную систему жидкость-жидкость получают, покрывая частицы, которыми упакована колонка, хиральной жидкостью. Элюент должен быть насыщен хиральной жидкой неподвижной фазой. Чтобы поддерживать постоянное равновесие системы, необходимо ее термостатировать. Пример использования этого метода приведен на рис. 22.3. В качестве жидкой неподвижной фазы используют (+)-дибутилтарtrate, на ней можно разделять различные β -аминоспирты.

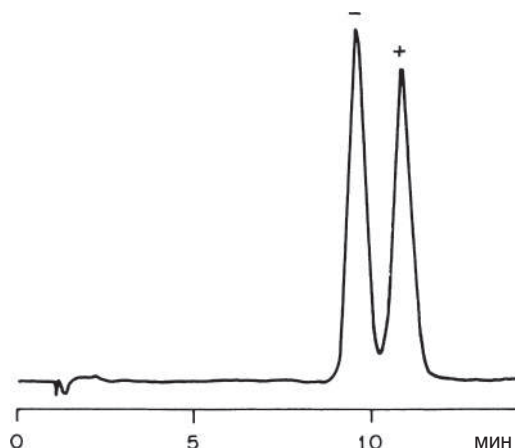


Рис. 22.3. Разделение энантиомеров норэфидрина на (+)-дибутилтарtrate (печатается с разрешения из С. Pettersson and H. W. Stuurman, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 441 (1984)). Условия: колонка 150×4,6 мм, неподвижная фаза — (+)-дибутилтарtrate, нанесенный на 5-мкм частицы PhenylHypersil, элюент — фосфатный буфер (pH 6), содержащий гексафторфосфат, насыщенный дибутилтарtrateм; УФ, 254 нм

22.4. Хиральные твердые неподвижные фазы¹

Если в наличии есть колонка с подходящей твердой хиральной неподвижной фазой (ТХНФ), то разделить пару энантиомеров не составит труда. К сожалению, не существует такого универсального сорбента, на котором можно было бы поделить любое вещество. Тем не менее разработано огромное количество ТХНФ, многие из которых можно приобрести. Кроме того, подходящий сорбент можно подобрать, изучив соответствующую литературу. Иногда образец можно адаптировать к выбранному сорбенту, используя ахиральную дериватизацию. Наиболее популярные ТХНФ перечислены в табл. 22.1 и объединены в группы по разным принципам разделения:

- а) ТХНФ «щеточного типа», у которых небольшие молекулы, обычно с π -активными группами, привиты к силикагелю;
- б) спиральные полимеры, главным образом целлюлоза и ее производные;
- в) фазы, молекулы которых способны формировать полость: циклодекстрины, краун-эфиры и макроциклические гликопептидные антибиотики;
- г) белковые фазы;
- д) лиганд-обменные фазы.

ТХНФ «щеточного типа»²

В разделе 7.5 указано, что к силикагелю можно привить практически любую функциональную группу, в результате чего образуются мономерные структуры, известные как «щеточки». Первым широко используемым и до сих пор очень популярным ТХНФ «щеточного типа» является динитробензоилфенилглицин (ДНБФГ) — первое соединение в табл. 22.1. Этот сорбент назвали в честь его изобретателя Уильяма Пиркла. Хотя более правильное название этого сорбента «Pirkle I», поскольку это не единственная коммерчески доступная его «именная» фаза.

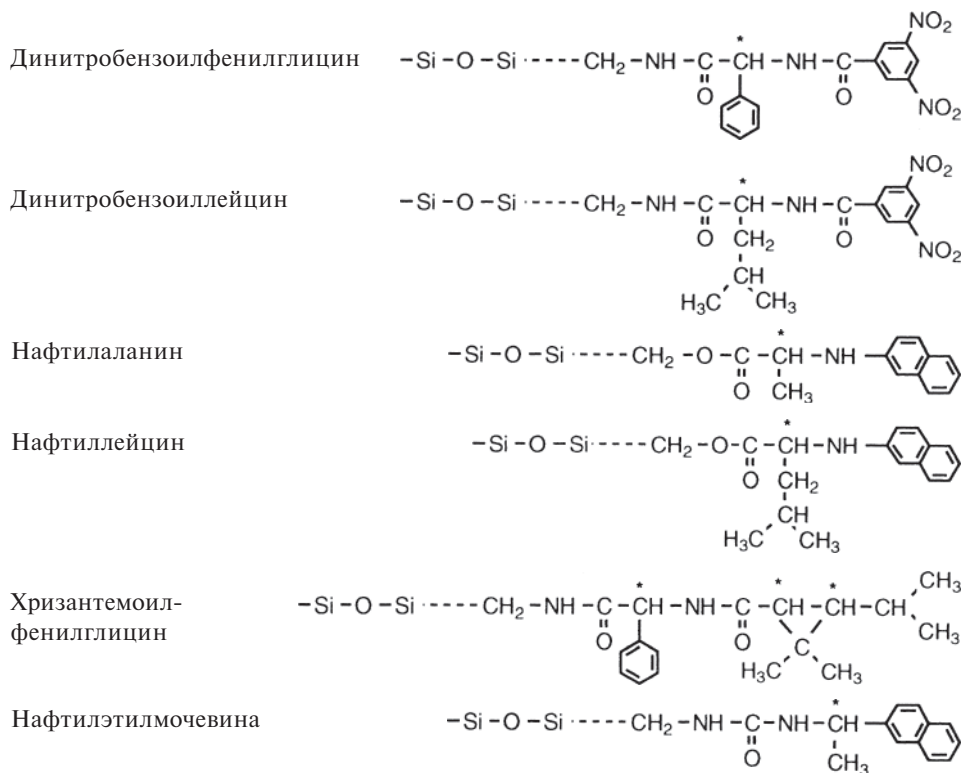
Для ДНБФГ характерен ряд особенностей, присущих практически всем фазам «щеточного типа». В его структуре имеются две лежащие в одной плоскости (планарные) амидные группы, вследствие чего вся хиральная часть молекулы может принимать определенное число конформаций (ограниченное), что важно для хирального распознавания. Кроме того, амидные группы могут участвовать в диполь-дипольном взаимодействии, а также образовывать водородные связи с молекулами образца. Динитробензоильная группа является π -акцептером (у кольца частично положительный заряд) и преимущественно будет взаимодействовать с π -донорами, такими как анилины, фенолы, хлорбензолы и нафталины. Предполагают, что π - π взаимодействие самое важное, и на практике ни одно разделение энантиомеров на «щеточных» фазах

¹ R. Däppen, H. Arm and V. R. Meyer, *J. Chromatogr.*, **373**, 1 (1986); D. W. Armstrong, *LC GC Int. Supl.*, April 1998, p. 22.

² C. J. Welch, *Advances in Chromatography*, P. R. Brown and E. Grushka, eds, **35**, 171 (1995); F. Gasparrini, D. Misiti and C. Villani, *J. Chromatogr. A*, **906**, 35 (2001); M. H. Hyun and Y. J. Cho, in: Gübitz and Schmid (первое примечание к этой главе), p. 197.

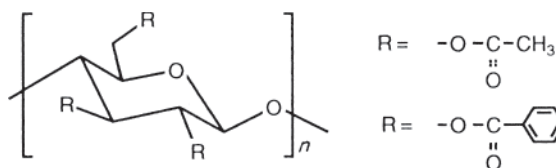
Таблица 22.1. Примеры хиральных неподвижных фаз для ВЭЖХ¹

«Щеточного типа»



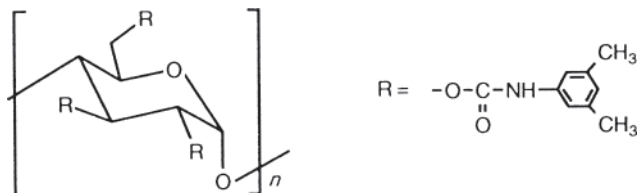
Спиральные полимерные

Триацетат целлюлозы



Трибензоат целлюлозы

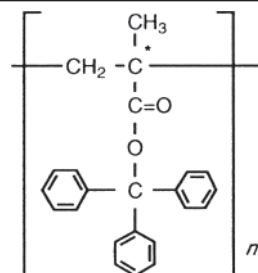
Трисдиметил-фенилкарбамат амилозы



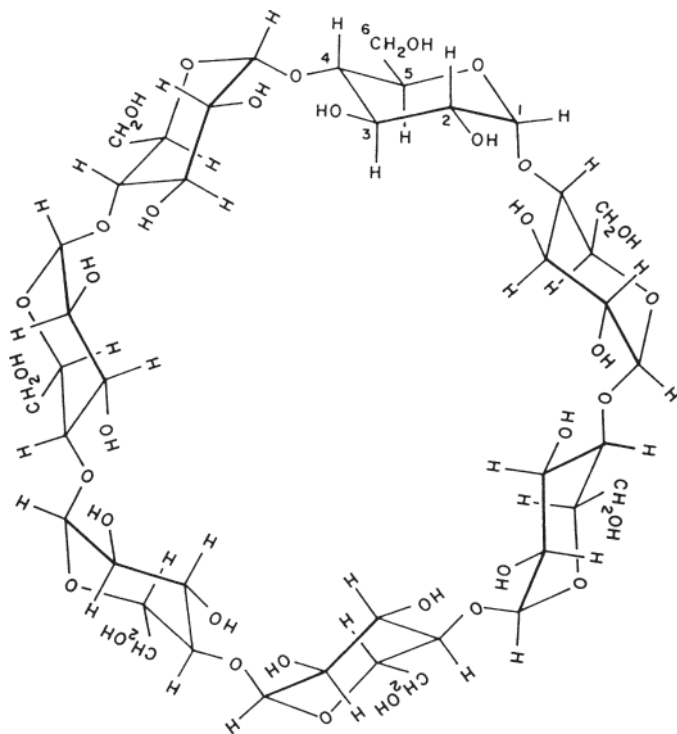
¹ Большинство из этих фаз химически привиты к силикагелю; пунктирная линия означает спейсерную группу, например цепочку CH_2 -групп. Здесь не указаны хиральные центры фаз. Некоторые сорбенты «щеточного типа» коммерчески доступны в обеих энантиомерных формах. У целлюлозы, амилозы, циклодекстрина, пептидов и белков указаны хиральные центры.

Таблица 22.1. (продолжение)

Поли(трифенилметилметакрилат)



Полые фазы

 β -Циклодекстрин

Краун-эфир

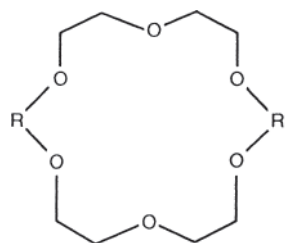
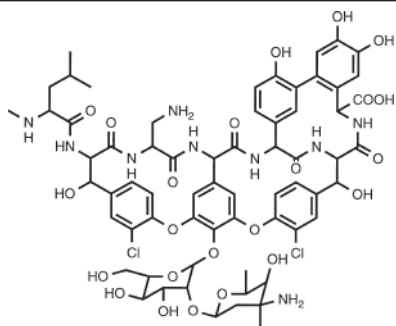




Таблица 22.1. (окончание)

Ванкомицин

*Белки*

Бычий сывороточный альбумин

Человеческий сывороточный альбумин

Кислый α_1 -гликопротеин

Овомукоид

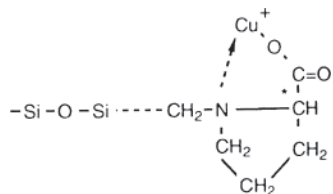
Авидин

Целлобиогидролаза I

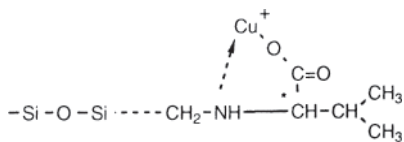
Пепсин

Лигандообменные фазы

Пролин-медь



Валин-медь



не обходится без такого участия. Поэтому ахиральная дериватизация пользуется популярностью: амины и аминокислоты превращают в нафтиламиды, спирты — в нафтилкарбаматы, карбоновые кислоты — в анилиды. Как правило, дериватизация — простая реакция, облегчающая процесс обнаружения, поскольку к молекуле образца присоединяют группу, отлично поглощающую в УФ-области. Сорбент ДНБФГ довольно дешевый и коммерчески доступен в двух энантиомерных формах. Это может быть важно при анализе следовых количеств, когда малый пик должен элюироваться до соседнего большого пика, или в препаративной хроматографии, в тех случаях, когда первый элюирующийся пик легче выделить в чистом виде, чем второй, который загрязняется

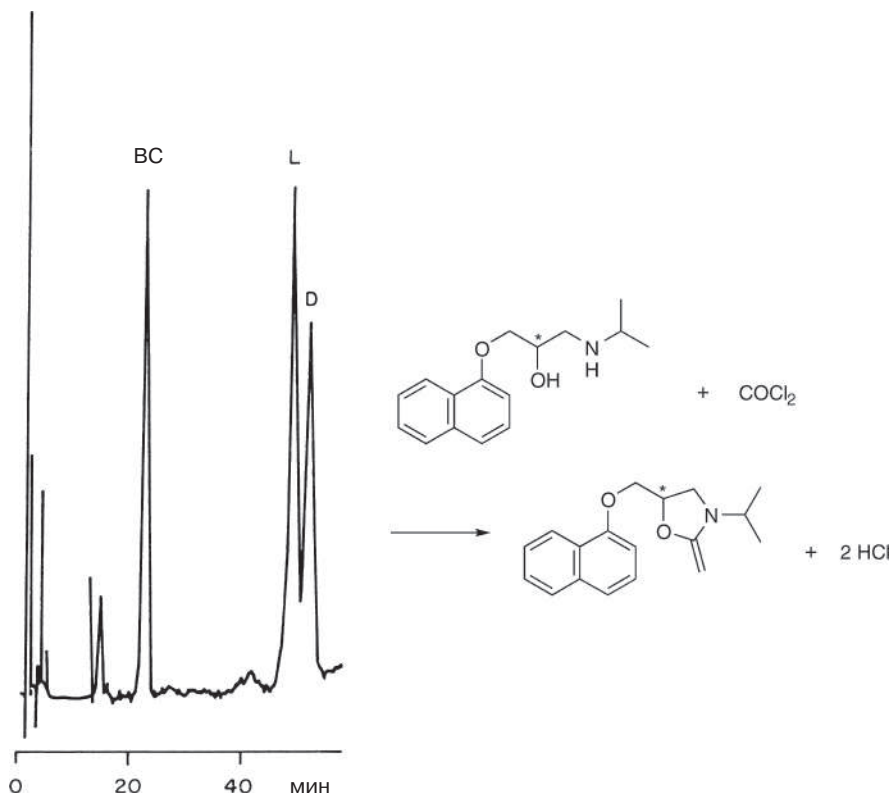


Рис. 22.4. Разделение рацемического пропранолола после дериватизации на динитробензоилфенилглициновой фазе (печатается с разрешения из I. W. Wainer, T. D. Doyle, K. H. Donn and J. R. Powell, *J. Chromatogr.*, **306**, 405 (1984)). Условия: образец — экстракт цельной крови (через 2,5 ч после введения 80 мг рацемата пропранолола), дериватизованный фосгеном, колонка $250 \times 4,6$ мм, сорбент — 3,5-ДНБ-фенилглицин, 5 мкм, подвижная фаза гексан-изопропанол-ацетонитрил (97:3:1), скорость потока 2 мл/мин, флуоресцентный детектор, 290–335 нм, BC — внутренний стандарт (оксазолидоновое производное пронеталола)

предыдущим. На рис. 22.4 приведен хороший пример успешного разделения на ДНБФГ силикагеле (D,L)-пропранолола из экстракта крови (в виде оксазолидонового производного).

Все другие ТХНФ «щеточного типа», перечисленные в табл. 22.1, работают по аналогичному принципу. Вот некоторые из них: динитробензоиллейцин, нафтилаланин, нафтиллейцин, хризантемоилфенилглицин, нафтилэтилмочевина. Все фазы специфичны к определенным классам соединений, хотя иногда сложно предугадать, какая фаза будет эффективнее. Узнать об индивидуальных способностях фаз можно из литературных источников или по каталогам производителей. ТХНФ «щеточного типа» устойчивы и обладают большой емкостью.



Спиральные полимеры¹

Немодифицированная микрокристаллическая целлюлоза в качестве сорбента неэффективна при ВЭЖХ-разделении энантиомеров. Большой интерес представляют ее производные, к тому же более универсальные. Для упаковки колонн доступна триацетилцеллюлоза, которая достаточно дешева, или силикагель с привитой триацетилцеллюлозой. Другими представителями этой группы являются трибензоатцеллюлоза (см. табл. 22.1), трис(фенилкарбамат)целлюлоза, трис(диметилфенилкарбамат)целлюлоза, трис(хлорфенилкарбамат)целлюлоза, трис(толуат)целлюлоза, трициннаматцеллюлоза. Эти фазы достаточно дорогие и, возможно, не такие жесткие, как ХНФ «щеточного типа», однако диапазон энантиомеров (классов соединений), которые можно разделить с их помощью, широк и наиболее впечатляющ в сравнении с другими ХНФ. Кроме того, помимо производных целлюлозы, существует поли(трифенил-метакрилат) и его производные, у которых одна из фенильных групп заменена на пиридинильную и на амилозные производные. Механизмы удерживания и разделения сложны и до сих пор до конца не изучены. Спиральные полимеры идеально подходят для разделения энантиомеров «скрученных» молекул с D_{2d} симметрией, а также для огромного количества «плоских» молекул.

Полые фазы

Существует три класса циклических хиральных селекторов: циклодекстрины, краун-эфиры и макроциклические гликопептидные антибиотики. Они могут формировать комплексы хозяин-гость с небольшими молекулами в том случае, если последние могут встраиваться в кольцевую структуру селектора. Встраивание требуется для контроля за разделением энантиомеров.

Циклодекстрины² содержат 6, 7 или 8 остатков глюкозы. Наиболее популярный β -циклодекстрин (см. табл. 22.1) представляет собой гептамер, у α -циклодекстрина 6 остатков глюкозы, а у γ -циклодекстрина их 8. Глюкоза сама по себе хиральна, а в составе циклодекстрина, который представляет собой усеченный конус, образует суперструктуру из первичных (расположенных по меньшему краю усеченного конуса) и вторичных (расположенных по большему краю усеченного конуса) гидроксильных групп, которые формируют хиральные точки связывания, необходимые в энантиоселективности. Эти группы можно дериватизировать, например ацилировать. Циклодекстрины часто используют вместе с водно-органическими элюентами, т. е. в обращенно-фазовых условиях. На таком сорбенте можно разделить разнообразные хиральные образцы, но сложно предугадать их пригодность к конкретному соединению.

¹ E. Yashima, *J. Chromatogr. A*, **906**, 105 (2001); C. Yamamoto and Y. Okamoto, in: Gübitz and Schmid (первое примечание к этой главе), p. 173; H. Y. Aboul-Enein and I. Ali, in: Gübitz and Schmid, p. 183; I. Ali and H. Y. Aboul-Enein, in: Subramanian (первое примечание к этой главе), p. 29.

² T. Cserhádi and E. Forgács, *Cyclodextrins in Chromatography*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2003, p. 53; C. R. Mitchell and D. W. Armstrong, in: Gübitz and Schmid (первое примечание к этой главе), p. 61.

Хиральные краун-эфиры¹ типа 18-краун-6 служат для разделения аминокислот, а также первичных аминов с близкой соседней аминогруппой² и с центром асимметрии. При разделении атомы кислорода краун-эфира взаимодействуют с протонами аминогруппы образца. Группы R и R' краун-эфира должны быть крупными и жесткими как, например, бинафтильная группа для того, чтобы заставить небольшие молекулы образца определенным образом взаимодействовать со связывающим доменом.

К макроциклическим антибиотикам³, таким, как ванкомицин или тейкопланин, относятся крупные гликозилированные молекулы, содержащие различные пептидные кольцевые структуры (не считая многочисленных фенольных колец). Их используют как в нормально-фазовых, так и в обращенно-фазовых режимах.

Белковые фазы⁴

Из курса биохимии известно, что многие белки, особенно ферменты, а также транспортные белки, например альбумин, проявляют высокую энантиоселективность при взаимодействии с небольшими хиральными молекулами. Белки можно привить к поверхности силикагеля. Это важный класс ХНФ, необходимый, главным образом, для разделения лекарственных субстанций, обладающих оптической активностью. Коммерчески доступны сорбенты со следующими привитыми белками: альбумином, α -гликопротеиновой кислотой, овомукоидом, авидином, целлобиогидролазой I и пепсином. Все они отличаются по своим хроматографическим и энантиоселективным свойствам, что закономерно, поскольку у всех белков этого ряда разные биологические действия, размеры, формы и изоэлектрические точки.

Белковые фазы весьма дороги, требуют аккуратного использования, и к тому же обладают малой эффективностью (число теоретических тарелок) и емкостью. Однако их энантиоселективность значительно перевешивает все имеющиеся недостатки.

Лигандообменные фазы⁵

Аминокислоты, привитые к силикагелю и образующие комплексы с ионами меди, могут стереоселективно взаимодействовать с аминокислотами в водном растворе (рис. 22.1). Лигандообменные фазы используют для разделения аминокислот, некоторых β -аминоспиртов и других похожих молекул с двумя полярными функциональными группами, находящихся на подходящем расстоянии

¹ М. Н. Hyun, in: Subramanian (первое примечание к этой главе), p. 275.

² Вместо соседней аминогруппы может быть и гидроксильная. Необходимое условие — наличие первичной аминогруппы. — *Прим. пер.*

³ T. L. Xiao and D. W. Armstrong, in: Gübitz and Schmid (первое примечание к этой главе), p. 113; T. E. Beesley and J. T. Lee, in: Subramanian (первое примечание к этой главе), p. 1.

⁴ J. Haginaka, *J. Chromatogr. A*, **906**, 253 (2001).

⁵ A. Kurganov, *J. Chromatogr. A*, **906**, 51 (2001); V. A. Davankov, *J. Chromatogr. A*, **1000**, 891 (2003); V. A. Davankov, in: Gübitz and Schmid (первое примечание к этой главе), p. 207.



друг от друга. Однако эти сорбенты не нашли широкого применения из-за достаточно низкой эффективности, сложного детектирования неderivатизированных соединений образца, а также из-за содержания ионов меди в подвижной фазе.

Если образец не удастся разделить на коммерчески доступных фазах, то возможным выходом является синтез в лаборатории специфичного хирального молекулярно импринтированного полимера (МИП)¹.

22.5. Непрямой метод разделения энантиомеров²

При derivатизации хиральным, оптически чистым, реагентом энантиомеры образуют *пару диастереомеров*. У диастереомеров есть несколько центров асимметрии, поэтому они различаются по физическим свойствам. На рис. 22.5 хорошо видно, что диастереомеры не могут быть зеркальным отражением друг друга. Их можно разделять в ахиральных хроматографических условиях, однако в любом случае необходимо тщательно подбирать derivатизирующий реагент.

Перед разделением следует учесть все рекомендации по предколоночной derivатизации, перечисленные в разделе 19.8. При этом одним из самых важных условий является оптическая чистота derivатизирующего реагента. В противном случае может образоваться четыре изомера (по две пары каждого энантиомера), а так как энантиомеры невозможно разделить в ахиральной системе, то результаты будут неправильными (табл. 22.2).

Следует учесть еще один важный пункт — предотвращение рацемизации во время derivатизации. Чтобы избежать рацемизации, необходимо derivатизирующий реагент брать в избытке. Перед введением образца на колонку избыток derivатизирующего реагента следует удалить, иначе на хроматограмме могут появиться дополнительные пики.

Желательно, чтобы функциональная группа, которую предполагается derivатизировать, располагалась близко к хиральному центру молекулы. Чем дальше оптические центры находятся друг от друга, тем сложнее будет разделить диастереомеры. Если есть возможность, то в результате реакции derivатизации

Таблица 22.2. Чистота реагента и полученная чистота образца

Чистота оптического реагента	Максимально зафиксированная оптическая чистота образца
99,95 %	99,9 %
99,5 %	99,0 %
98 %	96 %

¹ E. Turiel and A. Martin-Esteban, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1876 (2004); P. Spégel, L. I. Andersson and S. Nilsson, in: Gübitz and Schmid (первое примечание к этой главе), p. 217; B. Sellergren, in: Subramanian (первое примечание к этой главе), p. 399.

² N. Srinivas and L. N. Igwemezie, *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 163 (1992); X. X. Sun, L. Z. Sun and H. Y. Aboul-Enein, *Biomed. Chromatogr.*, **15**, 2001 (116).

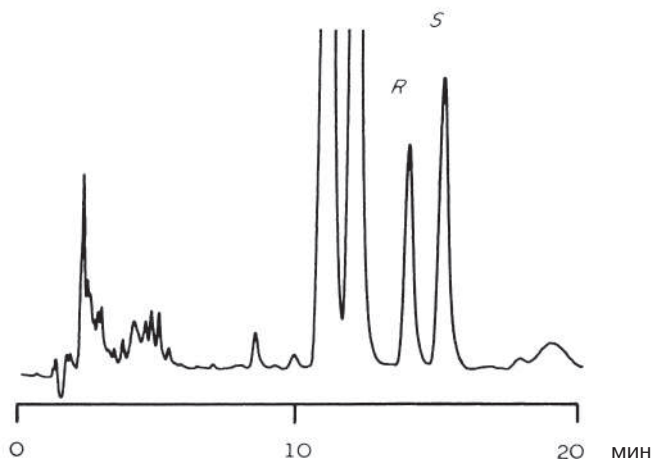
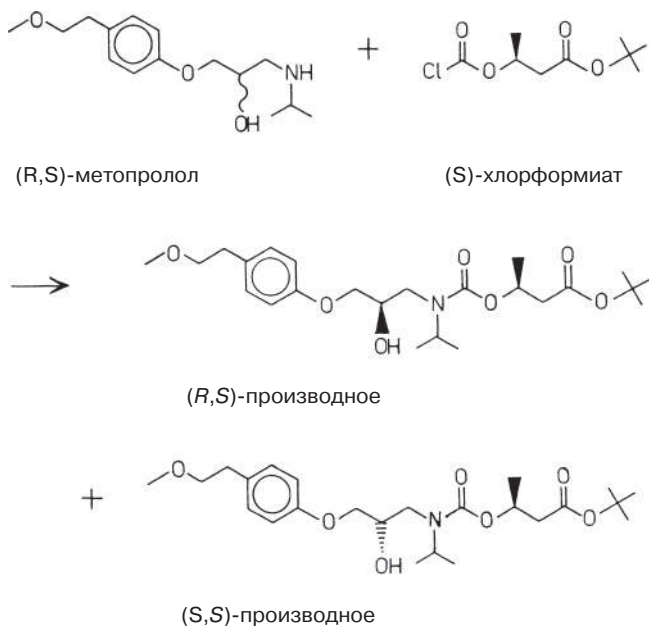


Рис. 22.5. Реакция (R,S)-метопролола с (S)-*трет*-бутил-3-(хлорформокси)бутиратом и определение соотношения энантимеров в плазме человека (печатается с разрешения из A. Green, S. Chen, U. Skantze, I. Grundevik and M. Ahnoff, poster at the 13th International Symposium on *Column Liquid Chromatography*, Stockholm, 1989). Условия: сорбент — силикагель C18, подвижная фаза — фосфатный буфер — ацетонитрил (1:1), флуоресцентный детектор 272/312 нм



лучше образовать амидную, карбаматную или уретановую связь. Соединения с такими связями имеют достаточно жесткую структуру (по сравнению, например, со сложноэфирными), облегчающую процесс разделения. Если есть возможность выбора, то лучше использовать такой изомер в качестве реагента, который позволит минорному компоненту из пары энантиомеров после дериватизации элюироваться из колонки раньше. Тогда маленький пик не затеряется в «хвосте» большого пика.

Диастереомеры *могут* по-разному детектироваться. Если проводят количественный анализ, то *необходимо* создать калибровочную кривую.

Непрямой метод разделения предпочтителен для образцов биологического происхождения. По сравнению с прямыми методами гораздо проще добиться отделения интересующих соединений от мешающих примесей. Разделение может быть выполнено на силикагеле (малорастворимые в воде образцы) или на C_{18} обращенной фазе (биологические образцы) (рис. 22.5).

ГЛАВА 23

ОСОБЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ

23.1. Капиллярная ВЭЖХ, микро-ВЭЖХ и ВЭЖХ на чипе¹

В настоящее время для ВЭЖХ разделений в основном используют колонки с внутренним диаметром 4,6 мм, хотя их эффективность ничуть не лучше, чем у колонок с внутренним диаметром 3,2 мм, да и требуемое количество подвижной фазы для них в два раза больше. Более того, существует ряд причин, по которым следует использовать колонки еще меньшего диаметра:

- а) потребление растворителя снижается пропорционально квадрату диаметра колонки;
- б) в разделе 19.2 уже упоминалось, что для определения следового количества вещества и при ограниченном количестве образца лучше всего использовать микроколонки;
- в) некоторые методики ЖХ-МС предусматривают низкие скорости подвижной фазы;
- г) колонки с маленьким и очень маленьким внутренним диаметром необходимы для достижения большого числа теоретических тарелок².

Колонки подразделяют на три категории:

- а) *открытые капилляры*. У капилляров с внутренним диаметром 50 мкм и меньше в качестве неподвижной фазы, которая может быть нормальной или обращенной, используется химически модифицированная стеклянная поверхность или жидкая пленка;
- б) *упакованные капилляры*. Капилляры, например, размером 15 см × 75 мкм можно упаковать обычным ВЭЖХ сорбентом или монолитным сорбентом;
- в) *микроколонки*. Подобны обычным ВЭЖХ-колонкам, но с внутренним диаметром не более 1 мм.

¹ J. P. C. Vissers, *J. Chromatogr. A*, **856**, 117 (1999).

² Скорее всего, это касается открытых капилляров, а не набивных колонок, так как набивные колонки диаметром 2,1 мм и менее имеют меньшее число теоретических тарелок, чем их аналоги диаметром 3 мм и более. См., например: Edward G. Franklin, *Ty Kahler LCGC Europe v. 29, Issue 7*, pg 378–383 (2016) или Thomas H. Walter, Richard W. Andrews *Trends in Analytical Chemistry Volume 63, December 2014, Pages 14–20*. — *Прим. пер.*



*Открытые капилляры*¹ с внутренним диаметром 5 мкм и числом теоретических тарелок 10^6 довольно легко изготовить. Теория показывает, что капилляры с внутренним диаметром <10 мкм выигрывают у упакованных колонок по таким показателям, как пиковая емкость, разрешение и продолжительность анализа. Однако технически сложно задать скорость потока 2 нл/мин и объем пробы 50 пл, но это не является неразрешимой проблемой.

*Упакованные капилляры*² позволяют увеличить емкость колонки, т. е. количество образца может быть больше, чем при использовании открытых капилляров. Недостатком таких капилляров является пониженная проницаемость.

*Микроколоники*³ с внутренним диаметром 1 мм (стальные трубки с внешним диаметром 1/16") коммерчески доступны. К преимуществам можно отнести повышенную чувствительность и экономию растворителей. Требования к оборудованию:

Насос	25–250 мкл/мин
Объем образца	0,2–1 мкл (максимальное количество образца за один ввод 10 мкг)
Объем ячейки детектора	0,5–1 мкл

Кроме того, существуют колонки из плавленого кварца с внутренним диаметром 0,2 мм. На рис. 23.1 представлен пример ВЭЖХ разделения на микроколонках. Пятнадцать желчных кислот, имеющих значение для установления возможного заболевания печени, выявляли в жидкостях организма. Для решения этой задачи понадобилась специальная хроматографическая система, способная формировать воспроизводимый градиент и смешивать малые объемы при небольшом расходе (общие затраты элюента 210 мкл), а также постколоночная дериватизация с последующим детектированием по флуоресценции, как описано в разделе 19.8. Используются следующие сокращения: UDC — урсодезоксихолевая кислота, С — холевая кислота, CDC — хенодесоксихолевая кислота, DC — дезоксихолевая кислота, LC — литохолевая кислота, G (приставка перед сокращенным названием кислоты) — глициновый конъюгат, T (приставка перед сокращенным названием кислоты) — тауриновый конъюгат.

Другой вариант представляют собой чипы с интегрированной частью для ВЭЖХ-разделения. Одной из реализаций является наличие на чипе прямоугольного канала размером, например, 75×50 мкм и длиной несколько сантиметров, который упакован обычным 5-мкм сорбентом⁴. Такой чип размером с кредитную карту вставляется в конструктивно совместимое с ним проточное устройство, выход из которого может быть направлен в электроспрей масс-спектрометра. Однако, как известно из теории полупроводников, настоящие чипы изготавливают исключительно из кремния методом литографии и травления⁵. Возможное устройство чипа, полученного таким способом, представляет

¹ R. Swart, J. C. Kraak and H. Poppe, *Trends Anal. Chem.*, **16**, 332 (1997).

² J. Hernández-Borges et al., *J. Sep. Sci.*, **30**, 1589 (2007).

³ R. P. W. Scott, *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 233 (1985); F. M. Rabel, *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 247 (1985).

⁴ H. Yin and K. Killeen, *J. Sep. Sci.*, **30**, 1427 (2007).

⁵ J. Eijkel, *Lab Chip*, **7**, 815 (2007); W. de Malsche et al., *Anal. Chem.*, **79**, 5915 (2007).

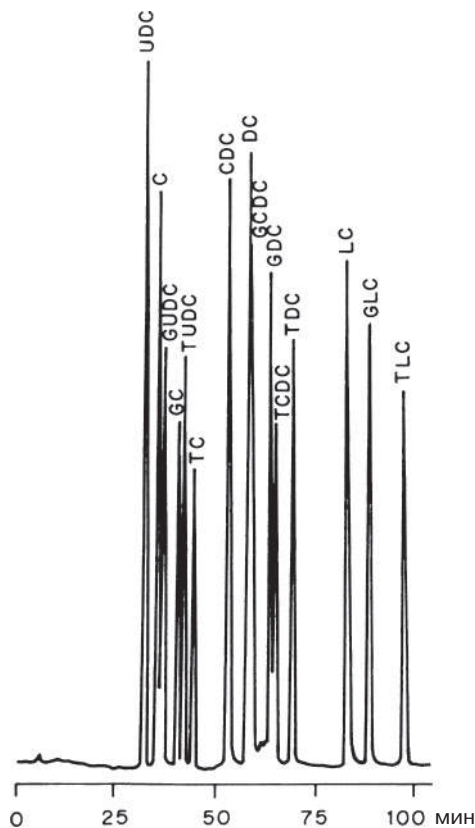


Рис. 23.1. Разделение желчных кислот на микро-ВЭЖХ (с разрешения D. Ishii, S. Murata and T. Takeuchi, *J. Chromatogr.*, **282**, 569 (1983)). Условия: образец — 11 нл раствора, содержащего 20 нг каждой кислоты, предколонка 50×0,2 мм и основная колонка 200×0,26 мм из плавленного кварца, сорбент — силикагель ODS CS-01, 5 мкм, подвижная фаза 60 мМ фосфатный буфер, содержащий NAD и ацетонитрил, градиент с увеличением содержания ацетонитрила, скорость подвижной фазы 2,1 мкл/мин, дериватизация иммобилизованным ферментом, флуоресцентный детектор 365/470 нм. Аббревиатуры приведены в тексте

собой последовательно расположенные цилиндры диаметром 5 мкм с одинаковыми зазорами между ними, перпендикулярные направлению потока¹. Свойства чипов могут быть сходными с нормально-фазовыми (если поверхность цилиндров будет из диоксида кремния) или обращенно-фазовыми (после дериватизации) сорбентами. На них можно проводить настоящие хроматографические разделения, однако в настоящее время они представляют собой всего лишь интересную экспериментальную разработку.

¹ Пространственно такая конструкция представляет собой множество цилиндров указанного диаметра и высотой около 0,2 мм, расположенных на одной плоскости, которую омывает поток. — *Прим. пер.*



23.2. Высокоскоростная и сверхскоростная ВЭЖХ¹

Рутинные анализы, особенно с простой пробоподготовкой, проводят за короткое время. Оборудование для таких экспериментов стоит дорого, но коммерчески доступно. Выделяют три категории ВЭЖХ:

Обычная ВЭЖХ	Время проскока $t_0 \approx 1$ мин
Высокоскоростная ВЭЖХ	Время проскока $t_0 \approx 10$ с
Сверхскоростная ВЭЖХ	Время проскока $t_0 \approx 1$ с

Для организации высокоскоростной и сверхскоростной² ВЭЖХ необходимо выполнение некоторых условий:

- а) высокий коэффициент диффузии молекул вещества в подвижной фазе. В связи с этим используют элюенты с очень низкой вязкостью. Желательно проведение разделений при повышенной температуре. Этот метод не подходит для разделения образцов с большой молекулярной массой;
- б) на рис. 2.29 и 2.30 ясно видно, что быстрые разделения проводят на колонках, упакованных мелким сорбентом. Это продиктовано теорией: минимально возможное время удерживания пропорционально квадрату диаметра частиц³;
- в) интересная возможность разделения при очень высоком давлении (УВЭЖХ) по сравнению с обычным (см. раздел 23.3);
- г) как можно более короткая колонка;
- д) предпочтительны упомянутые в разделе 7.3 перфузионные частицы и монолитные сорбенты⁴;
- е) минимальный внеколоночный объем хроматографической системы. Лучше всего избегать дополнительных объемов, особенно между инжектором и колонкой, колонкой и детектором. Лучшим решением будет такое, на рис. 23.2;
- ж) насос должен обеспечивать требуемую объемную скорость потока и давление. Чем меньше внутренний диаметр колонки, тем выше линейная скорость потока при заданной объемной скорости;
- з) время цикла работы автосамплера 10 с и меньше;

¹ Н. Chen and C. Horváth, *J. Chromatogr. A*, **705**, 3 (1995); D. Blanco, N. Sánchez and M. D. Gutiérrez, *J. Liquid Chrom. Rel. Techn.*, **29**, 931 (2006); A. C. Mann, *LC GC Int.*, **20**, 290 (2007).

² J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, **38**, 535 (2000).

³ Противодавление, которое дают частицы малого диаметра, делает невозможным использование обычных ВЭЖХ-систем, поскольку по уравнению Дарси давление пропорционально квадрату диаметра частиц и даже кубу при работе с оптимальными линейными скоростями потока. См.: D. T. Nguyen, D. Guilleme, S. Rudaz, J. L. Veuthey, *Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure*, *J. Sep. Sci.* **29** (2006) 1836–1848. — *Прим. пер.*

⁴ В настоящее время для высокоскоростной и сверхскоростной хроматографии предпочтительно использовать поверхностно-пористые и полностью пористые сорбенты с малым диаметром частиц, а для достаточно простых разделений — монолитные сорбенты. — *Прим. пер.*

- и) постоянная времени детектора и объем ячейки детектора должны быть достаточно малыми, чтобы не оказывать никакого влияния на разделение, т. е. они не должны влиять на форму пика или разрешение (рис. 23.3 и 23.4);
- к) быстрый сбор и обработка данных.

Очевидно, что высокоскоростная и сверхскоростная ВЭЖХ проводится вдалеке от минимума Ван-Деемтера. Это означает, что колонки не смогут продемонстрировать свою максимальную эффективность. В условиях сверхскоростной ВЭЖХ лучше всего реализуются изократические разделения, при этом также возможны сверхскоростные градиенты.

На рис. 23.3 приведен пример высокоскоростного разделения лекарственного препарата. Производитель использует этот метод в ежедневных анализах, определяя скорости растворения и однородность по составу. Сборка основных узлов аналогична схеме, показанной на рис. 23.2.

Еще быстрее проходит разделение, представленное на рис. 23.4. Тестовая смесь, состоящая из пяти компонентов, разделяется примерно за 3 с. При количественном анализе относительное стандартное отклонение составило менее 1,5%.

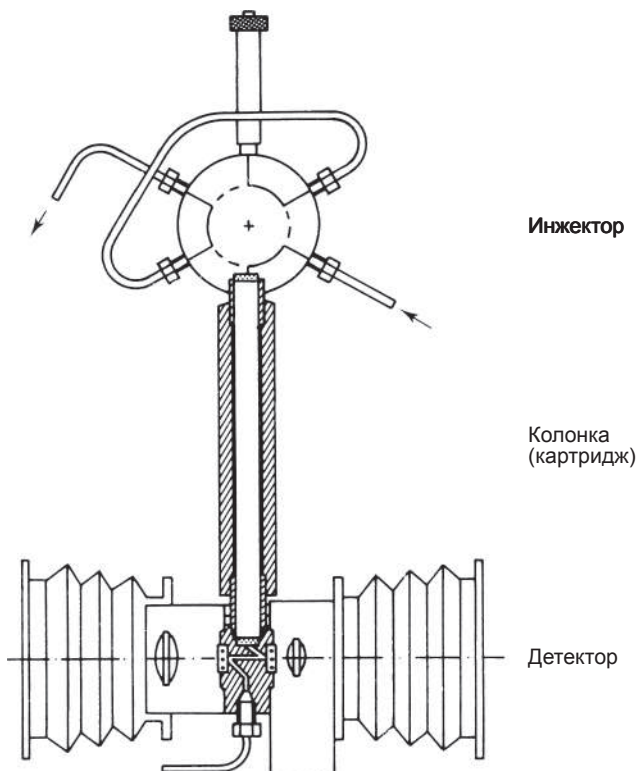


Рис. 23.2. Оптимизированная сборка инжектора, колонки и детектора (с разрешения Kontron Analytik)



Рис. 23.3. Высокоскоростное разделение гипотензивного лекарственного препарата (с разрешения F. Erni, Novartis). Условия: образец — 10 мкл раствора капсулы в искусственном желудочном соке, колонка $100 \times 2,1$ мм, сорбент Spherisorb RP-18, 5 мкм, подвижная фаза ацетонитрил — 0,4 М фосфорная кислота (85:15), скорость потока 3 мл/мин, УФ, 260 нм, объем ячейки детектора 2,8 мкл, длина оптического пути 10 мм, постоянная времени 0,1 с (98 %). Пики: 1 — клопамид, 2 — дигидроэргокристин, 3 — резерпин

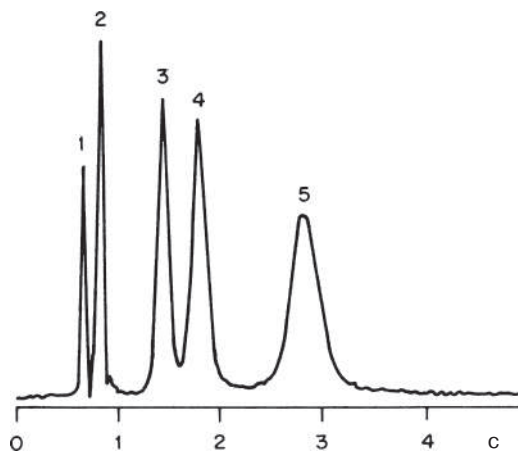


Рис. 23.4. Сверхскоростное разделение смеси из пяти компонентов (печатается с разрешения E. Katz and R. P. W. Scott, *J. Chromatogr.* **253**, 159 (1982)). Условия: образец 0,2 мкл, колонка $25 \times 2,6$ мм, сорбент Hypersil, 3,4 мкм, подвижная фаза пентан, содержащий 2,2 % метилацетата, скорость потока 13 мл/мин ($u = 3,3$ см/с), давление 360 бар, УФ, 254 нм, объем ячейки детектора 1,4 мкл, постоянная времени 6 мс, скорость сбора данных 100 точек/с. Пики: 1 — п-ксилол, 2 — метиловый эфир фенола, 3 — нитробензол, 4 — ацетофенон, 5 — дипропилфталат

23.3. Экспресс-разделения при 1000 бар: УВЭЖХ¹

Беглый осмотр рис. 2.29–2.31 показывает, что можно получить большее число теоретических тарелок или пиковую емкость, если увеличить рабочее давление. Кроме того, возможно проведение разделений в течение меньшего времени при той же эффективности при увеличении давления. (Однако если увеличить скорость потока, а сечение колонки оставить тем же, то разделение ухудшится — в силу вступает уравнение Ван-Деемтера. Увеличение только скорости потока не оптимизирует процесс.)

Создание насосов, работающих при давлении 1000 бар и отвечающих обычным требованиям, например отсутствие пульсаций, не зависящих от перепада давления, непростая задача. Тем не менее она выполнима. Требование высокой пиковой емкости (например, необходимой в протеомике) или быстрая разработка методики в промышленности привели к созданию и появлению на рынке

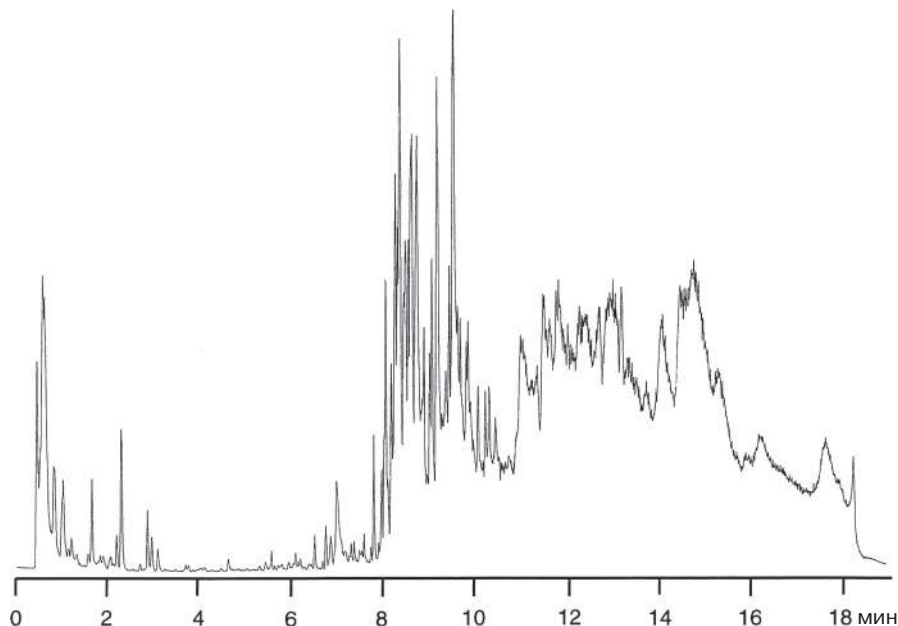


Рис. 23.5. Разделение методом УВЭЖХ (печатается с разрешения Т. Moritz, Nestlé Research Center, Lausanne, см. также S. J. Bruce *et al.*, *Anal. Biochem.*, **372**, 237 (2008)). Условия: образец — экстракт плазмы человека, колонка 100×2,1 мм, сорбент — C8 UPLC 1,7 мкм, подвижная фаза вода — ацетонитрил с 0,1 % муравьиной кислотой, линейный градиент, давление 600 бар, времяпролетный масс-спектрометр (TOF-MS) с положительным ИЭР. Первые пики — аминокислоты и низкомолекулярные метаболиты, пики в интервале 8–11 мин соответствуют фосфолипидам (кроме фоновых пиков)

¹ J. R. Mazzeo *et al.*, *Anal. Chem.*, **77**, 460 A (2005); M. E. Swartz, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, **28**, 1253 (2005); N. Wu and A. M. Clausen, *J. Sep. Sci.*, **30**, 1167 (2007).



такого рода приборов. Метод называется ультравысокоэффективная жидкостная хроматография (УВЭЖХ).

Не имеет смысла покупать насос для УВЭЖХ и использовать его в обычной системе для ВЭЖХ. Все узлы системы должны отвечать повышенным требованиям. Более того, чтобы УВЭЖХ показывала удовлетворительные результаты, рекомендуется использовать особые УВЭЖХ-колонок с УВЭЖХ-сорбентами. На рис. 23.5 показан метаболический профиль образца плазмы, полученный на УВЭЖХ-МС.

Исчерпывающее объяснение разделений при теоретическом давлении до 3000 бар дали Martin и Guiochon¹⁰. По-видимому, некоторые эффекты (сжимаемость подвижной фазы или тепловые эффекты, возникающие при давлении выше 1000 бар) препятствуют разработке и оптимизации методов разделения при таких давлениях.

23.4. ВЭЖХ со сверхкритическими подвижными фазами¹

В зависимости от температуры и давления чистое вещество может находиться в газообразном, жидком, твердом состояниях или даже в нескольких одновременно (взаимосвязь изображена на рис. 23.6). Если продвигаться по кривой насыщенных паров, разделяющей жидкое и газообразное состояния, в направлении увеличения давления и температуры, то можно попасть в область одинаковой плотности обеих фаз. Состояние, которое не является ни газообразным, ни жидким, расположенное за критической точкой Р (заштрихованная область), называется *флюидным* или *сверхкритическим*. Сверхкритическую жидкость можно использовать в качестве подвижной фазы в хроматографии, вследствие чего этот вид хроматографии стали называть сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ).

Сверхкритические подвижные фазы открывают новые возможности, находящиеся на стыке газовой и жидкостной хроматографии. Этот новый вид хроматографии подчиняется своим собственным законам. Вот некоторые интересные и необычные свойства сверхкритической хроматографии:

- а) коэффициенты диффузии находятся посередине между их значениями в газах (сравнительно большие, поэтому для ГХ необходимы высокие скорости потока) и жидкостях (сравнительно небольшие, поэтому для ВЭЖХ характерны меньшие линейные скорости потока);
- б) вязкость подвижной фазы выше, чем в газовой, но меньше, чем в жидкостной хроматографии;
- в) с увеличением давления повышается растворимость образца в подвижной фазе. Когда хотят повлиять на время удерживания, то градиенты формируют не только посредством изменения состава подвижной фазы, но и посредством изменения давления. Сильно удерживаемые вещества элюируются быстрее при повышенном давлении.

¹ R. M. Smith, *J. Chromatogr. A*, **856**, 83 (1999).

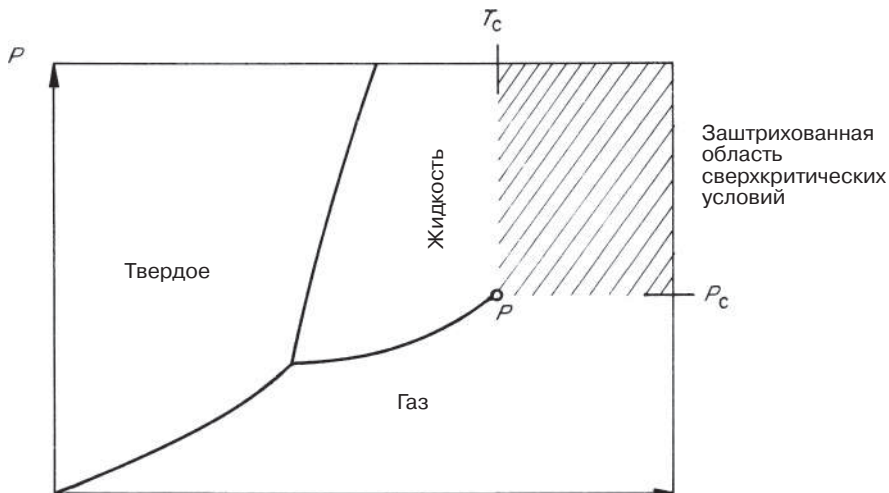


Рис. 23.6. Фазовая диаграмма чистого вещества

Давление насыщенных паров летучих образцов оказывает существенное влияние на их удерживание, как и в ГХ. В табл. 23.1 приведены соединения, которые потенциально можно использовать в качестве основного компонента подвижной фазы. Первые два вещества, очевидно, не подходят для разделения термолabileльных образцов. Чаще всего используется углекислый газ. Поскольку он очень неполярный, то в качестве растворителя В берут метанол.

В сверхкритической хроматографии требуется точный контроль давления и температуры. Прежде чем подвижная фаза попадет в инжектор, ее необходимо нагреть до соответствующей температуры. Краны, колонка и детектор должны располагаться в термостате. После детектора устанавливают рестриктор, чтобы вся система находилась под достаточно высоким давлением. Что касается колонок, то здесь можно использовать как открытые капилляры, которые могут иметь очень большое число теоретических тарелок, так и упакованные колонки (см. пример разделения на рис. 23.7). Обычно в СФХ используют УФ-детекторы, поляриметры (для разделения энантиомеров), МС, МС-МС и пламенно-ионизационный детектор, как в ГХ.

Полярные вещества плохо подходят для разделения методом СФХ. Растворять образец можно в метаноле или в менее полярном растворителе.

Таблица 23.1. Возможные растворители для сверхкритической ВЭЖХ

Вещество	p_k , бар	T_k , °C	d , г/см ³
<i>n</i> -Пентан	33,3	196,6	0,232
Изопропанол	47,0	253,3	0,273
Углекислый газ	72,9	31,3	0,448
Гексафторид серы	37,1	45,6	0,752



СФХ допускает разделения в препаративных и даже промышленных¹ масштабах (ненасыщенные жирные кислоты, циклоспорин, фитол). Особый интерес представляют разделения энантиомеров на хиральных сорбентах, которые можно осуществлять в нормально-фазовом режиме².

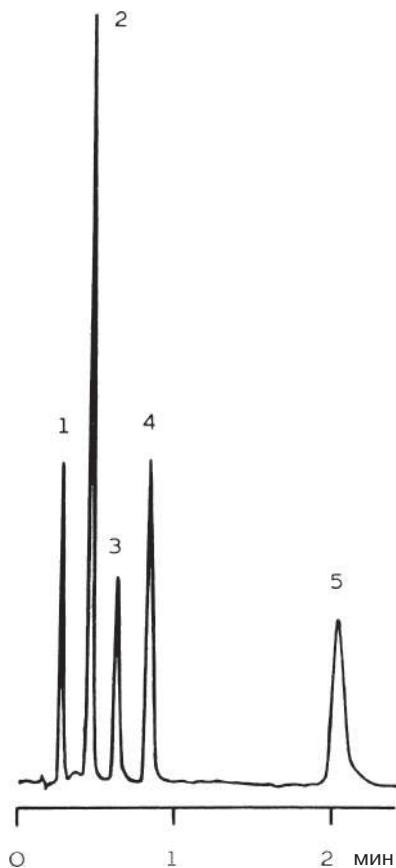


Рис. 23.7. Разделение опиумных алкалоидов с помощью сверхкритической хроматографии (с разрешения J.L. Janicot, M. Caude and R. Rosset, *J. Chromatogr.*, **437**, 351 (1988)). Условия: колонка 120×4 мм, сорбент Spherisorb NH₂, 3 мкм, подвижная фаза углекислый газ—метанол—триэтиламин—вода (87,62:11,80:0,36:0,22), скорость потока 8 мл/мин, давление 220 бар, температура 40,7 °С, УФ, 280 нм. Пики: 1 — наркотин, 2 — тебаин, 3 — кодеин, 4 — криптопин, 5 — морфин

¹ W. Majewski, E. Valery and O. Ludemann-Hombourger, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, **28**, 1233 (2005).

² D. Mangelings and Y. Vander Heyden, *J. Sep. Sci.*, **31**, 1252 (2008).

23.5. ВЭЖХ с перегретой водой¹

Перегретые жидкости даже ниже своей критической точки демонстрируют любопытные свойства. Особенно интересна перегретая вода при температуре выше 100 °С. На рис. 23.8 изображена кривая давления паров воды. Приведем пример: чтобы предотвратить закипание воды при 200 °С, давление следует увеличить до 16 бар. Более высокие температуры редко применяются, хотя критическая точка воды составляет 374 °С при 220 бар. Кривая давления паров указывает минимальное давление, при котором уже можно свободно подбирать хроматографические условия. Тем более это касается области над кривой.

С ростом температуры происходит существенное падение полярности воды. При 200 °С полярность воды практически равна полярности метанола. Поэтому допускаются разделения на обращенной фазе с градиентом температур, где в качестве элюента используют одну воду (рис. 23.9). Для работы в требуемых условиях ячейка детектора должна выдерживать высокое давление. После детектора устанавливается капилляр соответствующей длины и внутреннего диаметра, который служит рестриктором.

Преимущества технологии перегретой воды впечатляющи: она дешевая, доступна в любом месте и не наносит вреда окружающей среде, у нее хорошая УФ-прозрачность и совместимость с неспецифичным пламенно-ионизационным детектором. Увеличение температуры приводит к снижению вязкости, что способствует быстрому массопереносу. Многие образцы устойчивы к требуемым высоким температурам или, по крайней мере, устойчивы на время разделения. В качестве сорбента обычная обращенная фаза не подходит. Для ВЭЖХ с перегретой водой должен использоваться носитель со специальной привитой фазой. Допускаются полистиролы, сорбенты на основе циркония или пористый графитированный углерод. При этом следует учитывать индивидуальную температурную стабильность этих сорбентов. Разделения с перегретой водой проводят на упакованных капиллярах, а также на обычных ВЭЖХ-колонках.

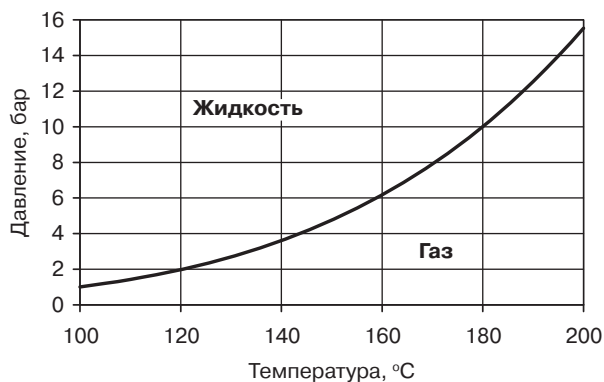


Рис. 23.8. Зависимость температуры кипения воды между 100 и 200 °С от давления

¹ R. M. Smith, *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 419 (2006); R. M. Smith, *J. Chromatogr. A*, **1184**, 441 (2008); K. Hartonen and M. L. Riekkola, *Trends Anal. Chem.*, **27**, 1 (2008).

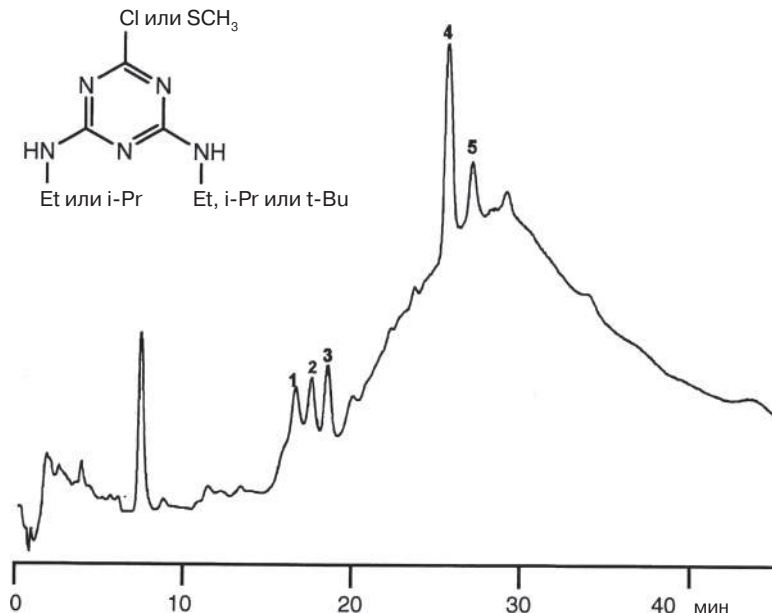


Рис. 23.9. Разделение триазинных гербицидов в перегретой воде при градиенте температуры (с разрешения R. Tajuddin and R. M. Smith, *J. Chromatogr. A*, **1084**, 194 (2005)). Условия: образец — экстракт верескового компоста, обогащенный триазиновыми гербицидами, колонка 100×2,1 мм, сорбент Нурегcarb 5 мкм (пористый графитовый углерод), подвижная фаза — вода, скорость потока 1 мл/мин, градиент температуры от 130 до 220 °С, давление 35 бар, УФ, 222 нм. Пики: 1 — пропазин, 2 — атразин, 3 — симазин, 4 — аметрин, 5 — тербутрин. Соединения 1–3 с остатком хлора, 4 и 5 содержат тиоэфирную группу

23.6. Электрохроматография¹

Движение подвижной фазы по капиллярам или колонке можно обеспечить не только с помощью насоса, но и благодаря электроосмосу. Это явление возникает на основе двойного электрического слоя, который появляется во всех пограничных слоях. Поверхность силикагеля или кварцевого стекла покрыта постоянным отрицательным избыточным зарядом, взаимодействуя с которым пограничный слой раствора становится положительно заряженным. Если задать статический градиент 50 кВ/м, то раствор потечет к отрицательному электроду.

У электрохроматографии есть явные преимущества:

- прямоугольный профиль потока, в отличие от насосной системы, в которой профиль потока представляет параболу. Снижается размывание пика из-за неравномерности распределения потока (А член в уравнении Ван-Деемтера);

¹ J. Jiskra, H. A. Claessens and C. A. Cramers, *J. Sep. Sci.*, **26**, 1305 (2003); U. Pyell, ed., *Electrokinetic Chromatography*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2006.

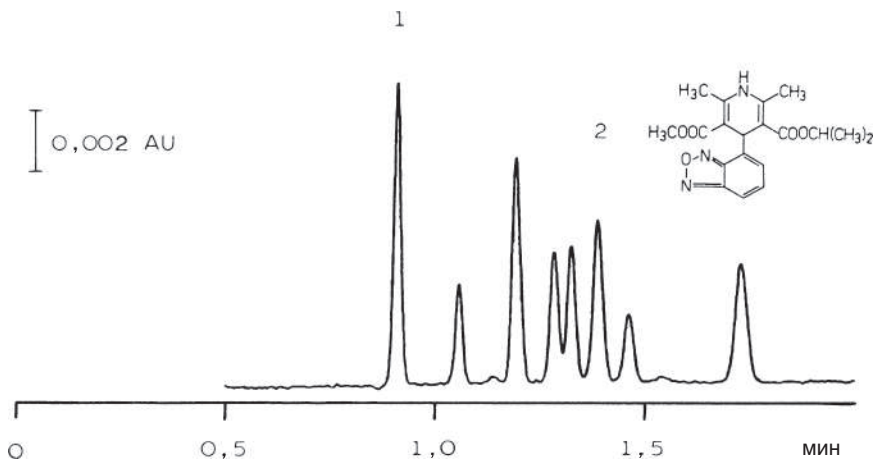


Рис. 23.10. Электрохроматографическое разделение (с разрешения Н. Yamamoto, J. Baumann and F. Erni, *J. Chromatogr.*, **593**, 313 (1992)). Условия: капилляр 14,3/32,4 см \times 50 мкм в.д., сорбент ODS Hypersil 3 мкм, подвижная фаза тетраборат натрия 4 мМ — ацетонитрил (20:80), скорость потока 2,6 мм/с, разность потенциалов 30 кВ, УФ, 220 нм. Пики: 1 — тиомочевина, 2 — исрадипин, остальные пики являются примесями исрадипина

- б) при использовании открытых капилляров¹ отпадает необходимость в капиллярах с малым внутренним диаметром. Эффективность разделения не зависит от диаметра капилляра. Длину капилляра выбирают в соответствии с потребностями. Сопротивление потока можно не учитывать. При этом разделение также эффективно, как и в капиллярной газовой хроматографии;
- в) поскольку сопротивление потока не имеет значения, то допускается разделение на капиллярах, упакованных мелкими частицами (≤ 1 мкм). Приведенная высота тарелки h меньше 2, что лучше, чем в традиционной ВЭЖХ.

Подвижная фаза должна обладать электропроводностью, поэтому используют буферные растворы от 0,001 до 0,1 М. Линейные скорости потока около 1 мм/с.

К недостаткам можно отнести сильный нагрев подвижной фазы при ее перемещении, поэтому требуется эффективное охлаждение и ограничение диаметра капилляров. Так до конца и не изучен переход к капиллярному электрофорезу, в котором молекулы образца *должны* быть заряжены² (в отличие от электрохроматографии). На рис. 23.10 приведен интересный пример быстрого и полного разделения лекарственного препарата и его примесей.

¹ L. A. Colón *et al.*, in: *Advances in Chromatography*, vol. 42, P. R. Brown and E. Grushka, eds, Dekker, New York, 2003, pp. 43–106.

² F. M. Everaerts, A. A. A. M. van de Goor, T. P. E. M. Verheggen and J. L. Beckers, *J. HRC*, **12**, 26 (1989).

ГЛАВА 24

ПРИЛОЖЕНИЕ I: ПРИКЛАДНАЯ ТЕОРИЯ ВЭЖХ

В главах 2 и 8 описаны принципы и следствия повседневно применяемой теории ВЭЖХ. Здесь же еще раз подробно повторены и подытожены важные уравнения. Отсутствуют выводы уравнений и ссылки, и то и другое можно найти в этих двух главах и в других разделах этой книги (см. предметный указатель). Кроме того, дополнительные статьи перечислены в ссылке, лежащей в основе этого приложения¹.

В качестве отправной точки описания теории взята типичная ВЭЖХ-колонка длиной 25 см (L_c) с внутренним диаметром 4,6 мм (d_c), упакованная сорбентом с размером частиц 5 мкм (d_p). Давайте определим, что можно вычислить по этим и некоторым другим данным.

Число теоретических тарелок N

Зная приведенную высоту теоретической тарелки h , можно вычислить N . Предположим, что колонка упакована не идеально, но очень хорошо, т. е. $h = 2,5$, тогда:

$$N = \frac{L_c}{hd_p} = \frac{250\,000}{2,5 \cdot 5} = 20\,000. \quad (1)$$

Комментарий

На самом деле для постоянно используемой колонки длиной 25 см с размером частиц 5 мкм число $N = 20\,000$ несколько завышено и встречается такое редко. Увы, число теоретических тарелок 10 000 и 15 000 выглядит куда более реалистично².

Мертвый объем V_0

У многих колонок, упакованных полностью пористыми частицами без привитых групп, общая пористость $\epsilon_{\text{общ}}$ составляет 0,8. Таким образом, можно определить V_0 :

¹ V.R. Meyer, *J. Chromatogr.*, **334**, 197 (1985), см. также M.A. Stone, *Mathematics of optimization and scaling for the practical chromatographer*, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, **30**, 605 (2007), включая оптимизацию градиентов.

² Время на месте не стоит, и теперь у таких колонок, если они новые, число теоретических тарелок, как правило, 23 000 и более, например у колонок Grace и Phenomenex. — *Прим. пер.*

$$V_0 = \frac{d_c^2 \pi}{4} L_c \epsilon_{\text{общ}} = \frac{4,6^2 \pi}{4} 250 \cdot 0,8 \text{ мм}^3 = 3320 \text{ мм}^3 = 3,3 \text{ мл.} \quad (2)$$

Комментарий

Поскольку V_0 пропорционален d_c^2 , то следует отметить, что V_0 уменьшится вдвое, если вместо колонки с внутренним диаметром 4,6 мм взять колонку с диаметром 3,2 мм. Именно по этой причине непонятно, почему колонки с $d_c = 4,6$ мм так популярны, ведь колонки с внутренним диаметром 3,2 мм позволяют сэкономить до 50 % элюента!

Линейная скорость потока u и объемная скорость потока F

Оптимальная приведенная скорость потока колонки считается равной $v_{\text{опт}} = 3$. Для вычисления оптимальной линейной и объемной скоростей потока подвижной фазы предположим, что коэффициент диффузии молекул вещества D_m в подвижной фазе равен $1 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{сек}$. Тогда:

$$u = \frac{v D_m}{d_p} = \frac{3 \cdot 1 \cdot 10^{-9}}{5 \cdot 10^{-6}} \text{ м} \cdot \text{с}^{-1} = 0,6 \cdot 10^{-3} \text{ м} \cdot \text{с}^{-1} = 0,6 \text{ мм} \cdot \text{с}^{-1}, \quad (3)$$

$$F = \frac{u d_c^2 \pi \epsilon_{\text{общ}}}{4} = \frac{0,6 \cdot 4,6^2 \cdot \pi \cdot 0,8}{4} \text{ мм}^3 \cdot \text{с}^{-1} = 8,0 \text{ мм}^3 \cdot \text{с}^{-1} = 0,48 \text{ мл} \cdot \text{с}^{-1}. \quad (4)$$

Комментарий

В адсорбционной хроматографии обычно коэффициент диффузии выше. Причина тому — невязкие органические растворители, следовательно, и оптимальная скорость потока здесь выше. При этом в обращенно-фазовой хроматографии коэффициент диффузии веществ в смеси метанол-вода меньше, поскольку вязкость такого элюента выше. Хотя это свойство не играет существенной практической роли при разделении малых молекул, о нем все-таки не стоит забывать. Вместе с тем в хроматографии макромолекул, у которых коэффициенты диффузии очень малы из-за их больших молекулярных объемов, это свойство имеет огромное значение, т. е. крупные молекулы необходимо элюировать с малыми скоростями потока.

Разделяющая способность колонки снижается, если скорость потока подвижной фазы превышает оптимальные значения. На хорошо упакованных микрочастицами ВЭЖХ-колонках этим эффектом вообще можно пренебречь, если приведенная скорость потока меньше 10.

Время удерживания t_R

Время выхода неудерживаемого соединения (t_0) составляет

$$t_0 = \frac{L_c}{u} = \frac{250}{0,6} \text{ с} = 417 \text{ с} \approx 7 \text{ мин.} \quad (5)$$

Времена удерживания двух удерживаемых веществ, коэффициенты удерживания которых составляют $k = 1$ и $k = 10$, равны:



$$t_R = k \cdot t_0 + t_0 = 1 \cdot 7 + 7 \text{ мин} = 14 \text{ мин}, \quad (6)$$

$$t_R = 10 \cdot 7 + 7 \text{ мин} = 77 \text{ мин}.$$

Комментарий

Если разделять вещества при оптимальной скорости потока, то их времена удерживания будут достаточно большими. Обратите внимание на то, что все времена удерживания не зависят от внутреннего диаметра колонки, если анализ проводится при заданной приведенной (или линейной) скорости потока. Все значения, полученные при использовании приведенных уравнений, кроме (9) и (12), не зависят от объемной скорости потока и времени удерживания.

Объем удерживания V_R

Объем подвижной фазы V_R , который необходим для элюирования соединений с коэффициентом удерживания $k = 1$ или $k = 10$, равен:

$$V_R = F \cdot t_R = 0,48 \text{ мл/мин} \cdot 14 \text{ мин} = 6,7 \text{ мл},$$

$$V_R = 0,48 \text{ мл/мин} \cdot 77 \text{ мин} = 37 \text{ мл}. \quad (7)$$

Комментарий

В обсуждении уравнения (2) уже упоминалось, что объем удерживания V_R пика пропорционален квадрату диаметра колонки! Если коэффициент удерживания пика, элюируемого первым, равен нулю ($k = 0$), т.е. этот пик неудерживаемый, то его объем удерживания составляет половину от вычисленного объема пика с $k = 1$, т.е. всего 3,3 мл (мертвый объем). В этом случае значения, вычисленные по уравнениям (10), (11), (13) и (14), будут меньше!

Пиковая емкость n

Если k для последнего пика равно десяти, то общая пиковая емкость равна:

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln(1 + k_{\max}) = 1 + \frac{\sqrt{20\,000}}{4} \ln(1 + 10) = 86. \quad (8)$$

Ширина пика 4σ и объем пика V_p

Если коэффициент удерживания первого пика составляет 1, то его ширина у базовой линии и его объем равны:

$$4\sigma = 4 \frac{t_R}{\sqrt{N}} = 4 \frac{14 \cdot 60}{\sqrt{20\,000}} \text{ с} = 23,8 \text{ с}, \quad (9)$$

$$V_p = 4\sigma \cdot F = 23,8 \cdot 8 \text{ мкл} = 190 \text{ мкл}. \quad (9a)$$

Комментарий

На ширину пика, выраженную в секундах, (уравнение (9)), влияет скорость потока подвижной фазы, в то время как на объем пика в микролитрах (уравнение (9а)) не влияет, при условии, что мы предполагаем незначительное изменение в количестве теоретических тарелок при изменении скорости потока. Несмотря на это, для определения постоянной времени детектора ширина пика в секундах является важным параметром (уравнение (12))!

Объем ввода пробы V_i

По уравнению (10) можно определить максимально допустимый объем пробы V_i , позволяющий избежать чрезмерного уширения первого пика:

$$V_i = \theta V_R \frac{K}{\sqrt{N}}, \quad (10)$$

где K — параметр, характеризующий качество инъекции, принимаемый равным 2¹, θ^2 — степень уширения пика. Так, если допускается 1 % уширение пика, параметр $\theta^2 = 0,01$ или $\theta = 0,1$, то:

$$V_i = 0,1 \cdot 6700 \frac{2}{\sqrt{20\,000}} \text{ мкл} = 9,5 \text{ мкл}.$$

При 9 % уширении пика $\theta^2 = 0,09$ или $\theta = 0,3$:

$$V_i = 0,3 \cdot 6700 \frac{2}{\sqrt{20\,000}} \text{ мкл} = 28 \text{ мкл}^2.$$

Комментарий

Обычно K принимают равным 2. Гораздо важнее то, что максимальный объем вводимой пробы зависит от объема удерживания анализируемого вещества. Поэтому для капиллярных колонок, у которых чрезвычайно маленький объем удерживания (поскольку V_R уменьшается пропорционально квадрату площади сечения капилляра), допустимый объем вводимой пробы измеряется в нанолитрах.

Существует способ избежать ограничений по вводимому объему. Если растворитель, в котором растворяют образец, значительно слабее используемой в ВЭЖХ-анализе подвижной фазы, т.е. его элюирующая сила меньше, тогда анализируемое вещество будет концентрироваться на входе в колонку. В этом

¹ Непонятный параметр, который может означать все, что угодно. К примеру, отсутствие пузырьков воздуха в инъекционной петле во время ввода образца, или плохую работу инжектора, или потери образца из-за некачественных уплотнений инжектора. Впрочем, это не самое удивительное. Почему он равен двум, а не пяти или одной десятой — вот настоящая загадка. — *Прим. пер.*

² По другим данным, объем инъекции может быть и более 80 мкл. См.: L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan Introduction to Modern Liquid Chromatography / Third Ed. John Wiley & Sons, Inc. 2010, p. 70–71. — *Прим. пер.*



случае объем вводимой пробы может быть необычайно большим и достигать миллилитров или даже литров¹.

Несмотря на это, существует обязательное требование относительно количества анализируемого вещества: оно должно быть достаточно малым, чтобы изотерма адсорбции не стала нелинейной².

Теперь обратим внимание на факт, важность которого будет очевидна позже в обсуждении предела обнаружения (уравнения (14–16)). Если для определения максимального объема пробы по уравнению (10) используют объем удерживания (37 мл) второго пика с $k = 10$, то значение V_i будет гораздо больше: можно ввести 157 мкл пробы без опасения, что второй пик размоется более чем на 9 %. Конечно, размывание пика, элюируемого первым, будет существенным, но вполне может быть и так, что рано элюируемые пики не представляют никакого интереса.

Объем ячейки детектора V_d

Максимально допустимый объем ячейки детектора V_d можно определить по уравнению:

$$V_d = \frac{\theta V_R}{\sqrt{N}} = \frac{V_i}{2}. \quad (11)$$

Так, при допустимом 1 % размывании пика $V_d = 9,5/2$ мкл ≈ 5 мкл, а при 9 % — $V_d = 28/2$ мкл = 14 мкл.

Комментарий

Вполне очевидно, что на колонке $250 \times 4,6$ мм, при использовании стандартной ячейки объемом 8 мкл первые пики размываются более чем на 1 %.

Постоянная времени детектора τ

Максимально допустимая постоянная времени детектора τ равна:

$$\tau = \theta \frac{t_R}{\sqrt{N}}. \quad (12)$$

Если размывание первого пика должно составлять не более 1 %, то:

$$\tau = 0,1 \frac{14 \cdot 60}{\sqrt{20\,000}} \text{ с} = 0,6 \text{ с}.$$

Если не более 9 %, то:

$$\tau = 0,3 \frac{14 \cdot 60}{\sqrt{20\,000}} \text{ с} = 1,8 \text{ с}.$$

¹ При этом возможны сдвиги времен удерживания, так как колонка фактически будет уравновешена не подвижной фазой, а растворителем, используемым для растворения пробы. — *Прим. пер.*

² Иными словами, необходимо избегать перегрузки по массе. — *Прим. пер.*

Комментарий

При работе на колонке длиной 25 см постоянная времени детектора не должна превышать 0,5 с. Все современные ВЭЖХ-детекторы соответствуют этому требованию. Если же колонка короче (10 или 5 см), то постоянная времени детектора 0,5 с слишком велика. С увеличением скорости потока постоянную времени детектора также следует уменьшить.

Длина капилляра $l_{\text{кап}}$

Максимально допустимую длину капилляра между инжектором, колонкой и детектором вычисляют по уравнению:

$$l_{\text{кап}} = \frac{384\theta^2 D_m V_R^2}{\pi N F d_{\text{кап}}^4}. \quad (13)$$

При допустимом 1 % размывании пика и внутреннем диаметре капилляра 0,25 мм его длина не должна превышать:

$$l_{\text{кап}} = \frac{384 \cdot 0,01 \cdot 10^{-5} \cdot 6,7^2}{\pi \cdot 20\,000 \cdot 8 \cdot 10^{-3} \cdot 0,025^4} \text{ см} = 8,8 \text{ см}.$$

При допустимом 9 % размывании:

$$l_{\text{кап}} = \frac{384 \cdot 0,09 \cdot 10^{-5} \cdot 6,7^2}{\pi \cdot 20\,000 \cdot 8 \cdot 10^{-3} \cdot 0,025^4} \text{ см} = 79 \text{ см}.$$

Комментарий

Важно понимать, что длина капилляра зависит от квадрата объема удерживания интересующего пика и обратно пропорциональна внутреннему диаметру капилляра в четвертой степени. На практике внутренний диаметр капилляра не должен превышать 0,25 мм. Чем короче капилляр, тем лучше.

Коэффициент разбавления c_i/c_p

Во время хроматографического процесса образец разбавляется. То есть концентрация образца в максимальной точке пика c_p ниже, чем во вводимом растворе c_i . Коэффициент разбавления определим как:

$$\frac{c_i}{c_p} = \frac{V_R}{V_i} \sqrt{\frac{2\pi}{N}}. \quad (14)$$

При максимально допустимом размывании пика 9 % и $k = 1$:

$$\frac{c_i}{c_p} = \frac{6700}{28} \sqrt{\frac{2\pi}{20\,000}} = 4,2,$$

для $k = 10$

$$\frac{c_i}{c_p} = \frac{37000}{28} \sqrt{\frac{2\pi}{20\,000}} = 23.$$

Концентрация вещества в пике в его максимальной точке c_p

Если концентрация каждого вещества в образце составляет 1 м.д. (10^{-6} г/мл), то при $k = 1$ их концентрации в максимальной точке равны:

$$c_p = c_i \frac{c_p}{c_i} = 10^{-6} \frac{1}{4,2} \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1} = 0,24 \cdot 10^{-6} \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}. \quad (15)$$

При $k = 10$

$$c_p = 10^{-6} \frac{1}{23} \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1} = 0,043 \cdot 10^{-6} \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}.$$

Комментарий к уравнениям (14) и (15)

Естественно, у пиков, элюируемых последними, размывание будет больше, по сравнению с рано элюируемыми пиками. Тем не менее, когда важен только пик с $k = 10$, объем вводимой пробы может быть увеличен до 157 мкл (см. обсуждение к уравнению (10)). В этом случае коэффициент разбавления второго пика будет таким же небольшим, равным 4,2, как и первого, при объеме инъекции 28 мкл. Значит, в обоих случаях концентрация в максимуме пика будет

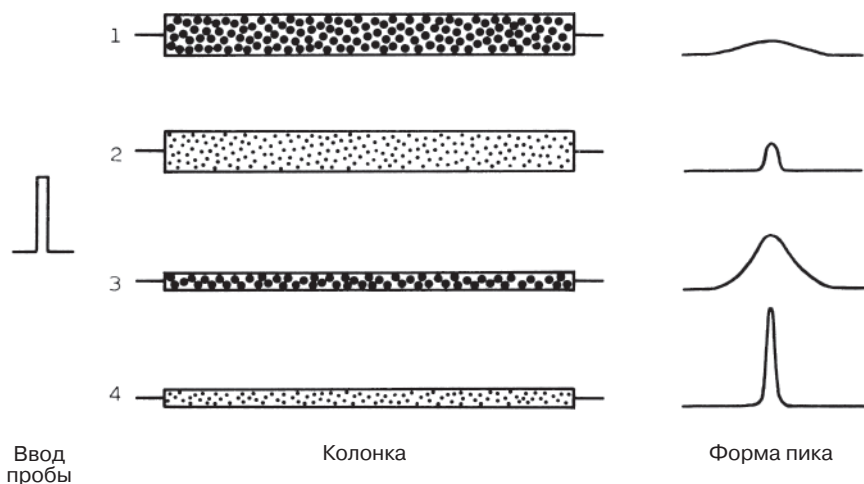


Рис. 24.1. Формы пиков, полученные на колонках разного диаметра и эффективности (в зависимости от диаметра частиц при данной длине колонки). Колонки 1 и 3 упакованы крупнозернистым сорбентом, колонки 2 и 4 — мелкозернистым. Качество упаковки, определяемое по приведенной высоте тарелки h , во всех четырех случаях одинаково. Эффективность разделения не зависит от внутреннего диаметра колонки, поэтому пики 1 и 3, так же как 2 и 4, соответственно, одинаковой ширины. Высоту пика определяют по уравнению (15): чем уже и эффективнее колонка, тем выше пик. Площади пиков нельзя сравнивать, если используется чувствительный к концентрации детектор, даже несмотря на то, что во всех случаях вводят одинаковое количество вещества, так как оптимальная скорость потока зависит от размера частиц и, следовательно, от времени пребывания в детекторе

одинакова ($0,24 \cdot 10^{-6}$ г/мл). Следует заметить, что это утверждение истинно только тогда, когда в обоих случаях используется соответствующий максимально допустимому объем пробы. Тогда c_p не зависит от объема удерживания пика (т.е. от внутреннего диаметра колонки или значения k) или от числа теоретических тарелок колонки.

На рис. 24.1, в противовес изложенным выше соображениям, показано влияние диаметра колонки и эффективности разделения (или размера частиц сорбента) на форму пика при одной и той же концентрации образца и объеме инъекции.

Интенсивность сигнала УФ-детектора A

Молярный коэффициент поглощения второго компонента (нитробензола) составляет $\epsilon = 10^4$ (254 нм), его молярная масса 123 г/моль. По закону Ламберта—Бера можно определить сигнал A , полученный на УФ-детекторе: $A = \epsilon cd$, где c — концентрация в моль/л, d — длина светового пути в см. Тогда $c_p = 0,043 \cdot 10^{-6}$ г/мл $= 0,35 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $d = 1$ см (как и у большинства УФ-детекторов), получим:

$$A = 10^4 \cdot 0,35 \cdot 10^{-6} \cdot 1 = 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ единиц абсорбции (а. у.)}. \quad (16)$$

Предел обнаружения

Обычным определением предела обнаружения является превышение сигнала вещества над сигналом шума в четыре раза (иногда в два раза). Стандартный уровень шума УФ-детектора составляет 10^{-4} единиц абсорбции¹. Это примерно на один порядок меньше величины, вычисленной по уравнению (16). Так как концентрация анализируемого раствора равна 1 м.д., то предел обнаружения этого соединения составит примерно 0,1 м.д. или, относительно вводимого объема 28 мкл, 2,8 нг.

Комментарий к уравнению (16) и пределу обнаружения

Что касается предела обнаружения, то следует различать минимальную детектируемую концентрацию и минимальную детектируемую массу. Минимальная детектируемая концентрация растворенного вещества в растворе образца зависит только от свойств детектора и оптических свойств растворенного вещества, т.е. его поглощения, если вводится максимально допустимый объем образца по отношению к объему удерживания вещества. Минимальная детектируемая концентрация не зависит от размеров колонки, числа теоретических тарелок или коэффициента емкости.

В противоположность концентрации, минимальная детектируемая масса зависит от коэффициента удерживания вещества. Чем раньше элюируется пик, тем меньше максимальный объем инъекции и тем меньше абсолютная масса

¹ У современных детекторов, таких, например, как Waters, Agilent или Shimadzu, уровень шума лежит в диапазоне 10^{-5} — 10^{-6} . — *Прим. пер.*



анализируемого вещества (если концентрация вещества постоянна). Такая же аналогия справедлива для колонок с меньшим внутренним диаметром¹.

Это означает, что для анализа следовых количеств, когда объем образца ограничен, что очень часто бывает в клинической или токсикологической химии, лучше использовать колонки с малым внутренним диаметром и небольшие коэффициенты удерживания. Если же количества образца достаточно, как, например, в анализах продуктов питания, то нет необходимости брать колонку с малым диаметром и низкие коэффициенты удерживания. Тем не менее следует учитывать время анализа, расход растворителей, перегрузку колонки сопутствующими примесями (здесь это не обсуждается).

Перепад давления Δp

Используя безразмерный параметр сопротивления потока ϕ , можно вычислить перепад давления:

$$\Delta p = \frac{4\phi L_c \eta F}{d_c^2 \pi d_p^2} = \frac{\phi \cdot L_c \text{ (мм)} \cdot \eta \text{ (мПа} \cdot \text{с)} \cdot F \text{ (мл/мин)}}{4,7 \cdot d_c^2 \text{ (мм}^2\text{)} \cdot d_p^2 \text{ (мкм}^2\text{)}} \text{ бар.} \quad (17)$$

Для сорбентов, упакованных суспензионным способом, при $\phi = 1000$ и вязкости $\eta = 1 \text{ мПа} \cdot \text{с}$ (вода или смесь вода-ацетонитрил):

$$\Delta p = \frac{1000 \cdot 250 \cdot 1 \cdot 0,48}{4,7 \cdot 4,6^2 \cdot 5^2} \text{ бар} = 48 \text{ бар.}$$

Комментарий

Если используются органические растворители низкой вязкости, например гексан, то перепад давления становится существенно меньше. И наоборот, значительно возрастает со смесью метанол-вода.

Выводы

Очевидно, что приведенные выше вычисления могут быть интересны и, более того, полезны для тех, кто выполняет рутинные анализы. Они позволяют выявить инструментальные и хроматографические ограничения и преимущества ВЭЖХ. Тем не менее теория не позволяет решить основную проблему хроматографии: какие необходимо выбрать условия, чтобы разделить разного рода соединения, присутствующие в образце?

Параметры разделения, которые помогут найти решение этой проблемы, можно определить из уравнения разрешения — основного уравнения жидкостной хроматографии:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \sqrt{N} \left(\frac{k}{1 + k} \right). \quad (18)$$

В этом уравнении есть три параметра, вычисление двух из которых — числа теоретических тарелок N и коэффициента удерживания k — уже описано.

¹ Чем меньше внутренний диаметр колонки, тем меньше минимально детектируемая масса аналита. — *Прим. пер.*

В принципе их можно изменять по желанию. Число теоретических тарелок можно изменить, используя более короткую колонку или соединив две или больше колонок. На коэффициент удерживания влияет элюирующая сила подвижной фазы. Коэффициент селективности α , в отличие от этих двух параметров, зависит только от физико-химических свойств системы, таких как адсорбционное, гидрофобное или ионообменное равновесие. Зачастую этот процесс сложен для понимания и поэтому приходится подбирать условия методом проб и ошибок. Разработка условий разделения с достаточной селективностью — это изящное хроматографическое искусство, а уравнения, например, приведенные выше, — это всего лишь вспомогательные инструменты для него.

ГЛАВА 25

ПРИЛОЖЕНИЕ 2: КАК ПРОВЕСТИ ТЕСТИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ

Bruno E. Lendi и Diego Bilgerig

Omnilab Ltd, CH-8932, Mettmenstetten, Swtzerland

25.1. Введение

В данной главе описана процедура проверки пригодности к стандартному режиму работы ВЭЖХ-системы¹ (PQ²) и все необходимые к ней протоколы. С помощью этой процедуры можно тестировать хроматографическую систему, работающую в изократическом или градиентном режиме, с УФ-детектором. Процедура не зависит от производителя ВЭЖХ-системы. В ходе тестирования системы проверяют работу насоса, автосамплера, УФ-детектора и термостата. Тестирование можно проводить в любой момент.

Все предлагаемые установленные значения хорошо зарекомендовали себя и могут быть адаптированы к конкретным требованиям.

Лабораториям, работающим по стандартам надлежащей производственной практики (GMP) или надлежащей лабораторной практики (GLP), рекомендуется тестировать хроматографическую систему сразу после установки, а затем не реже одного раза в год либо после смены местоположения. Если какой-либо узел хроматографа требует ремонта (например, насос), то после ремонта необходимо провести заново соответствующую часть тестирования.

25.2. Порядок проведения тестирования

Чтобы проверка ВЭЖХ-системы была эффективной, рекомендуется выполнять ее в следующей последовательности.

- а) Приготовление элюентов, включая их дегазацию. Первичную промывку хроматографа лучше проводить накануне тестирования.

¹ L. Kaminski *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**, 557 (2010).

² PQ — квалификация эксплуатации, включающая в себя определение метрологических характеристик, проверку характеристик насоса и термостата. — *Прим. пер.*

- б) Если хроматографом управляют без компьютера, то необходимо записать важные параметры и установки приборов. После тестирования с помощью этих данных можно восстановить исходные условия.
- в) Установить рабочие условия тестирования изократического или градиентного режима (раздел 25.3), тщательно промыв оба канала. Следует обратить внимание на базовую линию: при 100 %В поглощение не должно превышать 1 абсолютную единицу.
- г) Уравновесить систему при начальных рабочих условиях.
- д) Отметить в протоколах параметры системы и приборов.
- е) Произвести визуальный осмотр всех узлов хроматографа.
- ж) Тестируют насос (раздел 25.4). Если насос успешно прошел все тесты, то снимают внешний манометр и расходомер¹. Если по каким-то параметрам насос не проходит тест, то работу прекращают и проводят необходимый ремонт.
- з) Тест на линейность и воспроизводимость (раздел 25.3). В автосамплер устанавливают требуемое количество виал, программируют последовательность и начинают тест. При этом необходимо убедиться в том, что постоянная времени детектора и параметры интегрирования адекватны.
- и) Если колонка не находится в термостате, то можно параллельно провести его проверку (раздел 25.7).
- к) Сразу после теста на линейность определяют уровень шума детектора (раздел 25.5).
- л) Определяют точность установки длины волны детектора (раздел 25.5).
- м) Регистрируют профиль градиента (раздел 25.4).
- н) Проводят вычисления и заносят их в протоколы.
- о) Распечатывают все протоколы, проставляют дату и подписывают каждый протокол и весь документ.

25.3. Подготовка

Тестирование градиентной системы занимает практически целый день.

Подготовьте все элюенты, тестовые образцы. Кроме того, для тестирования хроматографа понадобятся колонка и измерительные приборы.

Общие данные

Перед тестированием заполняют следующие пункты:

- а) название хроматографической системы;
- б) модель и серийный номер каждого ее узла;
- в) объем инъекции;
- г) длина оптического пути ячейки детектора;
- д) производитель и номер партии колонки;
- е) производители, номера партий, сроки годности и молекулярная масса соединений, входящих в состав тестовых растворов.

¹ Те, которые использовались для определения точности. — *Прим. пер.*



Измерительное оборудование

Давление, скорость и температуру определяют только сертифицированными приборами. Действующие сертификаты копируют и прикрепляют к протоколам тестирования.

Элюенты

Для всех хроматографов готовят элюент 1 (Э1): смешивают при комнатной температуре 600 мл метанола и 400 мл воды, дегазируют. Для проведения градиентных тестов готовят элюент 2 (Э2): смешивают 1000 мл Э1 и 2 мл ацетона и очень быстро дегазируют (без вакуумирования!).

Тестовые растворы

В протоколах отмечают все перечисленные выше сведения обо всех соединениях¹. Все растворы готовят количественно, используя мерные колбы и пипетки.

Основной раствор: используют для тестов на воспроизводимость/линейность/перенос образца в следующий анализ: 199,5–200,5 мг бензофенона (ч. д. а.) растворяют в 100 мл метанола.

100 % тестовый раствор: поскольку поглощение 100 % тестового раствора должно лежать в интервале 0,7–0,9 AU, то в зависимости от объема инъекции и длины светового пути ячейки детектора основной раствор разбавляют элюентом Э1. Необходимый тестовый раствор готовят следующим образом.

Номер тестового раствора	Длина светового пути ячейки детектора	Объем инъекции	Приготовление 100 % тестового раствора
1	10 мм	1 мкл	Основной раствор (неразбавленный)
2	5 мм	5 мкл	40 мл основного раствора доводят до 100 мл Э1
3	10 мм	5 мкл	20 мл основного раствора доводят до 100 мл Э1
4	10 мм	20 мкл	5 мл основного раствора доводят до 100 мл Э1
5	8 мм	20 мкл	6 мл основного раствора доводят до 100 мл Э1
6	6 мм	20 мкл	15 мл основного раствора доводят до 100 мл Э1
7	6 мм	50 мкл	6 мл основного раствора доводят до 100 мл Э1
8	8 мм	100 мкл	3 мл основного раствора доводят до 100 мл Э1

(Из всех перечисленных растворов необходимо приготовить только один.)

50 % тестовый раствор: 25 мл выбранного 100 % тестового раствора доводят до 50 мл Э1.

1 % тестовый раствор: 5 мл 50 % тестового раствора доводят до 250 мл Э1.

0,1 % тестовый раствор: 5 мл 1 % тестового раствора доводят до 50 мл Э1.

¹ И непременно концентрацию веществ в растворах образцов. — Прим. пер.

Раствор антрацена: для проверки точности установки длины волны готовят раствор: 9,5–10,5 мг антрацена (ч. д. а.) растворяют в 100 мл метанола. 1 мл полученного раствора доводят до 100 мл Э1, получается раствор с примерной концентрацией 1 мкг/мл.

Если в детекторе есть встроенный фильтр из оксида гольмия, то тестирование проводят с использованием этого фильтра в соответствии с инструкцией производителя.

Условия для изократического тестирования

Подвижная фаза: Э1

Скорость потока: 1,5 мл/мин

Длина волны: 254 нм

Продолжительность теста: 8 мин

Постоянная времени детектора (или время отклика): ≤ 1 с

Колонка: LiChrospher 100RP 8, 5 мкм, сталь, 125×4 мм

Температура: комнатная

Последовательность ввода образцов:

Ввод пробы	Название	Описание
1	Холостой	Элюент 1
2	0,1 %/1	0,1 % тестовый раствор
3	0,1 %/2	0,1 % тестовый раствор
4	1 %/1	1 % тестовый раствор
5	1 %/2	1 % тестовый раствор
6	50 %/1	50 % тестовый раствор
7	50 %/2	50 % тестовый раствор
8	100 %/1	100 % тестовый раствор
9	100 %/2	100 % тестовый раствор
10	100 %/3	100 % тестовый раствор
11	100 %/4	100 % тестовый раствор
12	100 %/5	100 % тестовый раствор
13	100 %/6	100 % тестовый раствор
14	Холостой	Элюент 1 (перенос образца в следующий анализ)

Условия для градиентного тестирования

Подвижная фаза: Э1/Э2

Скорость потока: 2 мл/мин

Длина волны: 280 нм

Продолжительность теста: 70 мин



Постоянная времени детектора (или время отклика, время установления сигнала): ≤ 1 с

Колонка: LiChrospher 100RP 8, 5 мкм, стальной корпус, 125×4 мм

Температура: комнатная

Профиль градиента:

Время, мин	Э1, %	Э2, %	Описание
0	100	0	Шаг 0
5,0	100	0	
5,1	95	5	Шаг 1
10,0	95	5	
10,1	75	25	Шаг 2
15,0	75	25	
15,1	50	50	Шаг 3
20,0	50	50	
20,1	25	75	Шаг 4
25,0	25	75	
25,1	5	95	Шаг 5
30,0	5	95	
30,1	0	100	Шаг 6
40,0	0	100	
40,1	100	0	Шаг 7
50,0	100	0	
50,1	50	50	Шаг 8
55,0	50	50	
55,1	0	100	Шаг 9
60,0	0	100	
60,1	50	50	Шаг 10
65,0	50	50	
65,1	100	0	
70,0	100	0	

25.4. Тестирование насоса

Визуальный осмотр

Произвести визуальный осмотр включенного насоса (без потока), его головы, дисплея и т. д., а также всех соединений и капилляров. Если есть замечания, то составить план по их устранению и занести в протокол.

Давление при отсутствии потока

Открыть дренажный клапан и отметить указанное на дисплее давление.

Установленное значение:

- ☒ Давление ± 1 бар

В случае отклонения показание на дисплеи корректируют (если возможно) и это отмечают в протоколе.

Точность измерения давления, точность измерения скорости потока, прецизионность скорости потока

Присоединить к насосу внешние измерительные приборы давления и скорости потока, включить насос, задав скорость потока в соответствии с рекомендациями для изократического теста. Оставить насос хроматографа работающим в этих условиях на 10–15 мин. После чего в течение 6 мин с интервалом 1 мин фиксируют в протоколе показания измерительных приборов и давление на дисплее самого насоса.

Установленные значения:

- ☒ Точность измерения давления: ± 10 бар (значение давления на насосе минус давление на манометре).
- ☒ Точность измерения скорости потока: макс. 0,1 мл/мин (установленное значение минус значение на расходомере).
- ☒ Прецизионность скорости потока: макс. 0,02 мл/мин (максимальное измеренное значение минус минимальное измеренное значение).

Профиль градиента¹

Градиентные хроматографы тестируют на точность и прецизионность градиентного профиля (рис. 25.1), на величину объема задержки, объема смещения А и Б. Хроматографы, имеющие три и четыре канала, если требуется, тестируются следующим образом: А с В и В с Г соответственно. Сначала программируются условия градиента (раздел 25.3), затем хроматограф тщательно промывается начальной подвижной фазой, и запускается градиентный тест. Количественная оценка профиля градиента проводится в соответствии с рис. 25.2.

Примечания

Продолжительность изократической части каждого шага необходимо увеличить, если не наблюдается стабильность базовой линии в течение последних 2 мин.

¹ S. Marten, A. Knöfel and P. Földi, *LC GC Eur.*, **21**, 372 (2008).

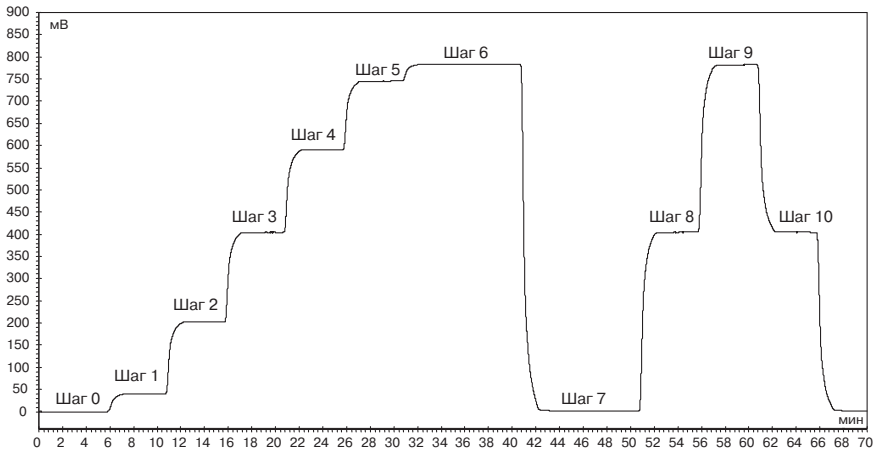


Рис. 25.1. Профиль градиента в соответствии с запрограммированными градиентными условиями. По оси ординат вместо мВ может быть mAE (mAU)

Если возникнет необходимость повторить этот тест, то рекомендуется использовать исходную конфигурацию системы, поскольку объем задержки вычисляется исходя из градиентного профиля.

Точность градиента

Судить о точности градиента можно по разнице между экспериментальным и запрограммированным значениями %В шагов 1–5.

Установленное значение:

- ☒ Точность градиента: $\pm 2\%$.

Прецизионность градиента

Судить о прецизионности градиента можно по изменяющимся значениям (в мВ или mAE) шагов 3, 8 и 10. Самая большая разница между установленными и полученными значениями и есть соответствующая характеристика системы.

Установленное значение:

- ☒ Прецизионность градиента: $\pm 2\%$.

Определение объема задержки и объема смешивания

Как определить время задержки ($t_{\text{задер}}$) и время смешивания ($t_{\text{смеш}}$), показано на рис. 25.3. Чтобы вычислить соответствующие объемы, достаточно время умножить на скорость потока насоса. Эти величины относятся к общей информации и не являются оценочными.

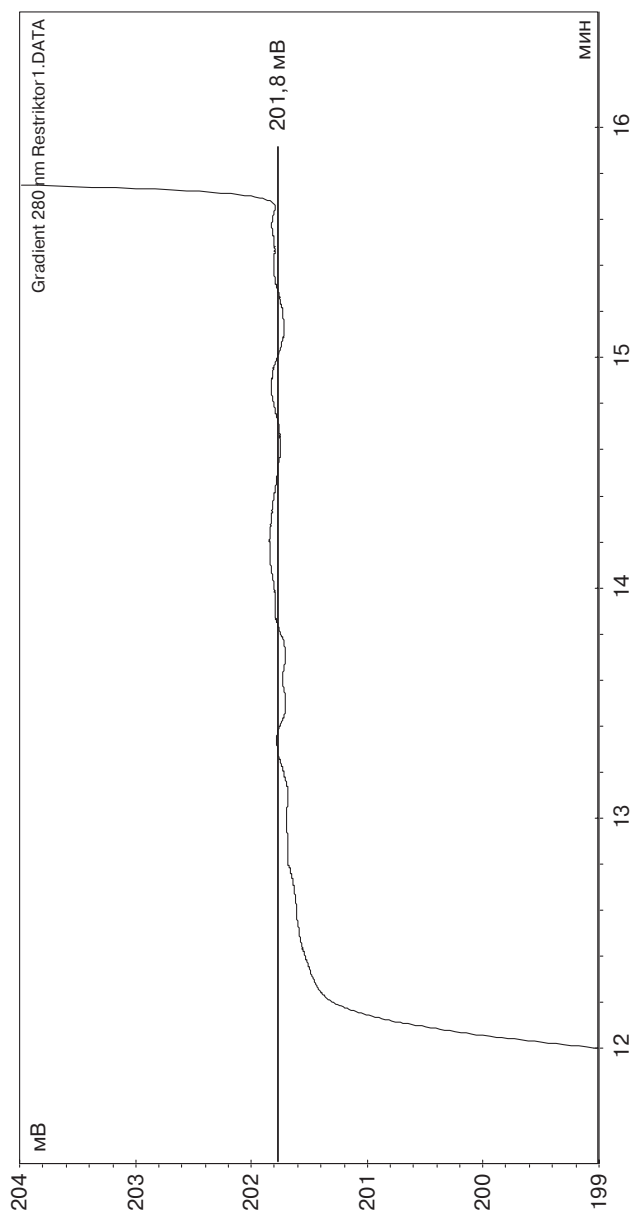


Рис. 25.2. Количественная оценка профиля градиента (показан только один шаг как пример). Для графических измерений необходимо каждый отдельный шаг на хроматограмме увеличить и распечатать. Высоту шагов определяют графически в мВ или мАЕ. Определение процентного содержания В в элюенте вычисляют по высотам шагов (раздел 25.8)

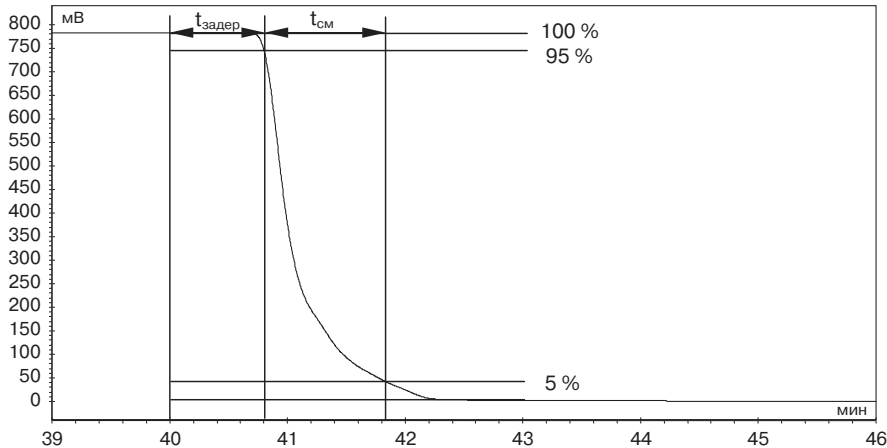


Рис. 25.3. Определение времени задержки и времени смешивания

25.5. Тестирование УФ-детектора

Визуальный осмотр

Включить детектор и провести визуальный осмотр дисплея и соединений. Если есть замечания, то составить план по их устранению и занести в протокол.

Шум

Уравновешивают систему в изократических условиях не менее 30 мин. Для определения динамического шума сигнала детектора записывают хроматограмму, по крайней мере, в течение 10 мин. Затем определяют уровень шума, выбирая на хроматограмме подходящий отрезок длиной 10 мин (рис. 25.4). Причем на этом отрезке не должно быть сомнительных пиков или пиков-призраков.

На принтере распечатывают хроматограмму, шум определяют в мм, переводят в АЕ и заносят в протокол

Установленное значение:

- ☒ Шум: $1 \cdot 10^{-4}$ АЕ или меньше.

Точность установки длины волны

Ячейку детектора заполняют раствором антрацена. Измеряют детектируемую интенсивность поглощения при изменении длины волн в интервале от 248 до 254 нм с шагом в 1 нм. Полученные значения отмечают в протоколе, находят максимум. Для сканирующего детектора в качестве альтернативного подхода можно записать УФ-спектр и прикрепить его к протоколу.

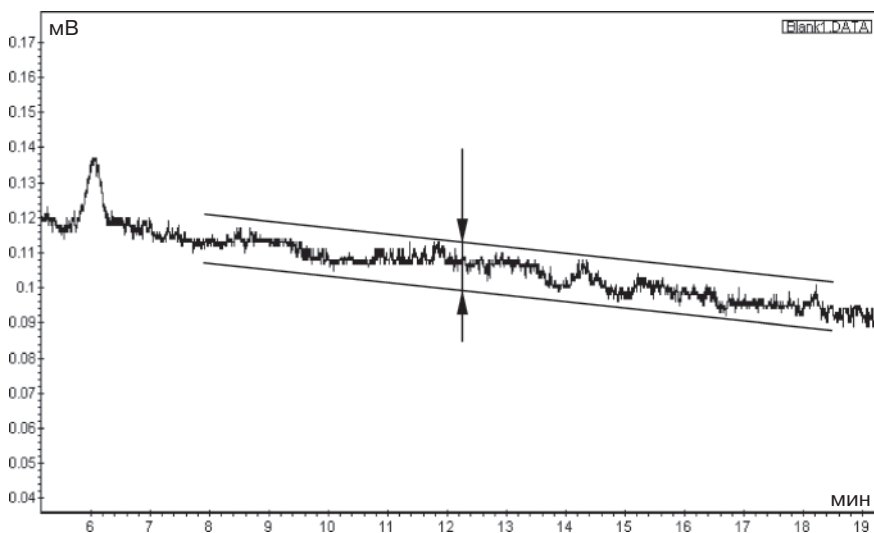


Рис. 25.4. Графическое определение шума

Установленное значение:

- ☒ Точность длины волны: $251 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$.

Если в детекторе есть встроенный фильтр из оксида гольмия, то тестирование проводят с использованием этого фильтра в соответствии с инструкцией производителя.

Примечание: если автоматическое обнуление после смены длины волны нельзя выключить, то сначала ячейку детектора заполняют непоглощающей подвижной фазой, затем устанавливают нулевое значение, потом заполняют антраценовым раствором, после чего измеряют поглощение.

Линейность

Для определения линейности используют эксперименты 2–9 из условий для изократического тестирования. По площадям пиков вычисляют коэффициент корреляции.

Установленное значение:

- ☒ Коэффициент корреляции: 0,99 или выше.

Определяют средние значения площадей пиков 0,1; 1; 50 и 100 % тестовых растворов соответственно. Исходя из средних значений, вычисляют нижеуказанные соотношения и отмечают в протоколе.

Установленные значения:

- ☒ Соотношение 1 % к 0,1 %: 8,0–12,0
- ☒ Соотношение 100 % к 1 %: 97–103



25.6. Тестирование автосамплера

Визуальный осмотр

Включить автосамплер и провести визуальный осмотр дисплея и соединений. Если есть замечания, то составить план по их устранению и занести в протокол.

Повторяемость

Повторяемость определяют по экспериментам 8–13 из условий для изократического тестирования. Прецизионность (в %) вычисляют по площадям пиков (раздел 25.8).

Установленные значение:

- ☒ Прецизионность: $\pm 0,8\%$ или меньше.

Перенос образца в следующий анализ

Проверку автосамплера на перенос образца в следующий анализ проводят по экспериментам 13 и 14 из условий для изократического тестирования.

Установленное значение:

- ☒ Перенос: 0,1 % и меньше для автосамплеров с функцией промывки, 0,2 % и меньше для автосамплеров без функции промывки.

Примечание: в протоколе следует отметить объем вводимой пробы и количество промывок.

25.7. Тестирование термостата

Визуальный осмотр

Включить термостат и провести визуальный осмотр дисплея и соединений. Если есть замечания, то составить план по их устранению и занести в протокол.

Точность и стабильность поддержания температуры

Проверку проводят при 20 и 40 °С. Если у термостата нет функции охлаждения, то тестирование при 20 °С не проводят. Кроме того, термостат можно протестировать и при более высокой температуре, главным образом, при которой он постоянно работает.

В зависимости от типа термостата температура в камере, где установлена колонка, может сильно отличаться, поэтому датчик температуры устанавливают следующим образом:

- а) при принудительной циркуляции воздуха датчик устанавливают как можно ближе к колонке;
- б) в термостате без принудительной циркуляции устанавливают непосредственно на металлической поверхности камеры (теплообменника).

В протоколе отмечают местоположение датчика температуры (например, «температура измерена около колонки»).

Прежде чем проводить тестирование, термостат нагревают и выдерживают при заданной температуре не менее 30 мин. Во время проведения теста температуру датчика и показания на дисплее термостата фиксируют в течение 30 мин с интервалом 10 мин, значения заносят в протокол.

Установленные значения:

- ☑ Точность отображения температуры на дисплее: макс. $\pm 1^\circ\text{C}$ (среднее значение на дисплее термостата минус заданное значение для термостата).
- ☑ Точность поддержания температуры в термостате: макс. $\pm 3^\circ\text{C}$ (среднее значения показаний датчика минус заданное значение для термостата).
- ☑ Стабильность поддержания температуры: макс. 1°C (разница максимального и минимального показаний датчика).

25.8. Уравнения и вычисления

Определение процентного количества элюента В в тесте градиента:

$$\text{шаг } x[\%] = \frac{\text{высота}_{\text{шаг } x} - \text{высота}_{\text{шаг } 0}}{\text{высота}_{\text{шаг } 6} - \text{высота}_{\text{шаг } 0}} \cdot 100.$$

Определение прецизионности автосамплера:

$$\text{точность } [\%] = \frac{\text{стандартное отклонение}}{\text{средняя величина измеренных значений}} \cdot 100;$$

стандартное отклонение =

$$= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{значение}_i - \text{средняя величина измеренных значений})^2}{n-1}}.$$

Определение переноса образца в следующий анализ (автосамплер):

$$\text{перенос образца } [\%] = \frac{\text{площадь}_{\text{вкол14}}}{\text{площадь}_{\text{вкол13}}} \cdot 100.$$

Коэффициент корреляции линейности детектора:

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n\sum x^2 - (\sum x)^2] \cdot [n\sum y^2 - (\sum y)^2]}}.$$



25.9. Протоколирование

Все измеренные параметры, вычисления и замечания протоколируются. Человек, выполняющий все эти действия, обязан проставить дату и подписать документы от руки. На всех распечатанных протоколах также проставляются даты и подписи. Кроме того, в протоколах отмечаются те тесты, которые не дали нужных результатов, даже если соответствующий узел сразу же был отрегулирован или отремонтирован. Повторные тесты в протоколе отмечают как повторные.

ГЛАВА 26

ПРИЛОЖЕНИЕ 3: НЕИСПРАВНОСТИ

Бруно И. Ленди

OmniLab Ltd, Метменштеттен, Швейцария

26.1. Проблемы, связанные с давлением

Слишком высокое давление в системе

Загрязненный элюент (и, как следствие, загрязненные фильтры, капилляры, краны и/или колонка):

→ Фильтруйте подвижную фазу. Загрязненные элюенты лучше всего вылить и приготовить свежие. Очищенную воду нужно менять гораздо чаще, чем органические растворители, из-за того, что в ней заводятся водоросли и бактерии.

Загрязненный выходной фильтр насоса (линейный фильтр):

→ Замените фильтр. Если на фильтре видны черные частички (и не одна), необходимо заменить уплотнение плунжера насоса и, скорее всего, сам плунжер. Кроме того, проверьте уплотнение на инертность к элюенту, который вы используете. (Надо сказать, что в настоящее время материалы, из которых изготавливают уплотнения, устойчивы ко всем общеупотребительным растворителям, включая воду).

Забитые капилляры:

→ Замените их или попробуйте прокачать в обратном направлении. Внимание: не затягивайте слишком сильно фитинги ПЭЭК-капиллярную

Неправильно установлен фитинг с ферулой (или только ферула):

→ Используйте соответствующие вашему оборудованию фитинги и ферулы. Не надо устанавливать уже использованные капилляры, ферулы и фитинги из других систем, поскольку это может привести к повышению давления или большим внеколоночным объемам.

Засорился кран-инжектор высокого давления:

→ Замените уплотнение ротора и/или статора крана. Если поверхность статора поцарапана, то его обязательно нужно заменить. В противном случае новое уплотнение ротора довольно быстро придет в негодность.

Колонка слишком стара или загрязнена:

→ Замените колонку или промойте ее. Возможно, вам придется промыть ее обратным током элюента (без присоединения к детектору).

Выпадение образца в осадок:

→ Проверьте растворимость образца в элюенте и полноту смешивания раствора образца с подвижной фазой. Всегда лучше растворять образец в подвижной



фазе (в случае градиентной элюции в той смеси, которая будет проходить через колонку в момент инъекции)¹.

Неправильный состав подвижной фазы:

→ Проверьте, правильно ли вы приготовили подвижную фазу и все ли компоненты в ней присутствуют в должном количестве. Проверьте, не ошиблись ли вы при написании градиентной программы. Зачастую лучше всего приготовить свежую подвижную фазу в строгом соответствии со стандартной операционной процедурой.

Колебания температуры:

→ Падение температуры элюента на 10 °C может привести дополнительно к возрастанию противодавления вплоть до 40 бар².

Неверный расход насоса:

→ Проверьте и в случае необходимости свяжитесь с сервисной службой производителя.

Слишком низкое давление

Износились уплотнения плунжеров насоса:

→ Замените уплотнения. Внимание: не используйте воду для того, чтобы начать работу с новыми уплотнениями. Изопропанол или метанол для этой цели подходят больше.

Текущие клапаны насоса:

→ Промойте их на большой скорости потока или в ультразвуковой бане или замените.

Утечка после насоса:

→ Следите за этим постоянно и устраняйте.

Неправильный состав подвижной фазы:

→ Проверьте, правильно ли вы приготовили подвижную фазу и все ли компоненты в ней присутствуют в должном количестве. Проверьте, не ошиблись ли вы при написании градиентной программы. Зачастую лучше всего приготовить свежую подвижную фазу в строгом соответствии со стандартной операционной процедурой.

Колебания температуры:

→ Повышение температуры элюента на 10 °C может привести к понижению противодавления вплоть до 40 бар.

Неверный расход насоса:

→ Проверьте и в случае необходимости свяжитесь с сервисной службой производителя.

Колебания давления

Поврежденные клапаны насоса и/или изношенные уплотнения:

→ Замените клапаны или уплотнения.

¹ То есть в том составе подвижной фазы, в котором колонна уравнивается перед инъекцией. — *Прим. ред.*

² В отдельных случаях противодавление может вырасти и больше. Все зависит от вязкости элюента. — *Прим. пер.*

Пузырьки воздуха или газа в голове насоса:

→ Промойте насос при открытом сливном кране с высокой скоростью потока. Дегазируйте подвижную фазу или используйте встроенный в хроматографическую систему дегазатор. (Это необходимо в случае градиентных систем низкого давления.)

Засоренный входной фильтр насоса:

→ Проверьте и замените его, если это необходимо¹. Водные элюенты гораздо чаще засоряют входные фильтры, чем органические растворители.

26.2. Утечка в системе подачи подвижной фазы

Текут уплотнения со стороны промывки заплунжерного пространства или уплотнения высокого давления:

→ Замените уплотнения, проверьте, нет ли повреждений плунжеров и, если это необходимо, замените их.

Повышение уровня в резервуаре, в котором находится растворитель, идущий на промывку плунжера:

→ Это явное свидетельство того, что уплотнения высокого давления пора менять.

26.3. Изменения/отклонения времен удерживания

Обычно эти проблемы вызваны насосом или устройством, формирующим градиент:

→ Проверьте расход с помощью мерного цилиндра и секундомера. Может быть, вам придется заменить уплотнения или клапаны.

Утечка перед колонкой:

→ Постоянно проверяйте и устраняйте утечки.

Температурные изменения (особенно в летнее время):

→ Используйте колоночный термостат с возможностями нагрева и охлаждения.

Более летучий компонент испаряется из резервуара для подвижной фазы:

→ Охлаждайте резервуар. Накрутите на него воздухонепроницаемую крышку с клапаном. Это не только предотвратит испарение, но даст еще и хороший побочный эффект — в воздухе лабораторного помещения не будет паров растворителей. Смешивайте растворители внутри ВЭЖХ-системы даже в случае изократических разделений.

Профиль градиента или состав подвижной фазы отличается от того, запрограммирован в методе:

→ Проверьте клапаны насоса на предмет утечек. Как правило, все это происходит из-за кристаллизации солей в клапанах². Лекарство от этого простое:

¹ Можно этот фильтр попробовать очистить в ультразвуковой бане. — *Прим. пер.*

² Это могут быть не только клапаны насосов, но и клапаны устройства формирования состава подвижной фазы. — *Прим. пер.*



промывка свободными от солей растворителями перед тем, как вы собрались выключить насос! Внимание: различные хроматографические системы имеют различные объемы смешивания и задержки. Во время градиентных разделений следите за временем уравнивания между инъекциями и продлевайте его в случае необходимости. Проверьте ваш градиентный метод.

В общем, если вы заметили изменение мертвого времени системы t_0 , то это говорит о проблемах с насосом или об утечках в системе, а если изменились коэффициенты удерживания соединений, то проблемы с термостатированием или составом подвижной фазы.

26.4. Проблемы ввода образца

Перенос образца из предыдущего инжектирования

Обычно это связано с устройством ввода образца:

→ Замените износившиеся части автосамплера, такие как игла, капилляр между иглой и краном, уплотнение ротора и/или статора крана.

Реже встречающиеся, но более сложные причины:

→ Осмотрите соединения капилляров и замените их. Замените петлю инжектора. Замените капилляры. Проверьте колонку и замените ее, если это необходимо. Переполненные виалы. Неправильно подобранный растворитель для промывки иглы автосамплера.

Плохая воспроизводимость ввода образца

Обычно это связано с устройством ввода образца:

→ Проверьте и замените износившиеся части так, как это описано выше.

И вообще, каждый узел хроматографической системы должен быть под подозрением (!):

→ Плохо работающий насос. Невоспроизводимый градиент. Переохлажденный образец. Загрязненная подвижная фаза. Резервуар промывочного растворителя в автосамплере пуст. Часть образца застряла в устройстве ввода: выпала в осадок или закристаллизовалась. Виала с образцом в автосамплере плохо/неправильно установлена. Плохо подобрана септа. В виалах возникает вакуум. Слишком быстрый перенос образца от виалы к петле¹. Негерметичный шприц для инъекций в автосамплере. Замените шток шприца или весь шприц².

Проверьте, точно ли автосамплер отбирает запрограммированный объем: виалу с раствором образца взвешивают до и после отбора. Если отбор образца сделан без потери раствора, то разница в массах должна соответствовать объему (с учетом плотности раствора образца). Если же автосамплер отбирает больше раствора, то следует при расчетах принять это во внимание.

¹ Слишком быстрый забор образца из виалы. — *Прим. пер.*

² Во многих автосамплерах нет никакого шприца. Необходимо проверить уплотнения системы забора образца. — *Прим. пер.*

26.5. Проблемы, связанные с базовой линией

Шум базовой линии

Ультрафиолетовая лампа выработала свой ресурс:

→ Замените и отъюстируйте в случае необходимости.

Низкая интенсивность излучения на коротких длинах волн в ультрафиолетовой области:

→ Замените лампу, даже если на длине волны, например, 254 нм она еще работает удовлетворительно. Замените окна в ячейке спектрофотометра¹. Проверьте, прозрачна ли при выбранной длине волны ваша подвижная фаза и чиста ли она. Хорошо ли дегазирован ваш элюент. Используйте дегазатор.

Шум даже после замены УФ-лампы все равно велик:

→ Проверьте, правильно ли юстирована лампа. Промойте окна в кювете спектрофотометра или замените их.

Насос не работает должным образом:

→ Проверьте и исправьте так, как это описано выше.

Пузырек воздуха или газа попал в ячейку детектора:

→ Промойте ячейку на большой скорости потока. Если ячейка выдерживает повышенное давление, то можно предотвратить образование пузырьков с помощью длинного капилляра (например, 0,25 мм × 10 м), присоединенного к выходу детектора².

Электрические помехи от другого оборудования:

→ Используйте сетевой фильтр. Установите вашу ВЭЖХ-систему в другое место.

Сквозняк³:

→ Отключите систему кондиционирования воздуха. Установите вашу ВЭЖХ-систему в другое место.

Дрейф базовой линии

Подвижная фаза:

→ Неполное смешивание⁴ или недостаточная дегазация могут быть причинами, вызывающими дрейф базовой линии. Рекомендуется использовать дегазатор и колоночный термостат⁵.

¹ В некоторых ячейках (особенно в аналитических) современных спектрофотометров сделать это невозможно — они не разбираются. — *Прим. пер.*

² Лучше не изводить 10 м дорогого капилляра, а использовать небольшое проточное устройство под названием «Back-Pressure Regulator». Мало того, его можно еще и отрегулировать на нужное вам противодействие. — *Прим. пер.*

³ Сквозняк воздействует, скорее, на дрейф базовой линии, а не на шум. — *Прим. пер.*

⁴ Вот это как раз может вызвать не только дрейф, но и заметный шум базовой линии. — *Прим. пер.*

⁵ И самое главное — хорошо бы улучшить смешивание. — *Прим. пер.*



Загрязненная колонка:

→ Если вы готовы каждый раз после разделения терпеливо промывать колонку, то эта проблема чаще всего и не возникнет. Загрязнения, которые могут оставаться в колонке от предыдущих нанесений, нужно вымывать подходящими для этого элюентами

Существенные изменения/пульсации давления во время работы насоса:

→ См. советы, описанные в разделе «Колебания давления»: если дрейф базовой линии проявляется только на коротких длинах волн в УФ, вполне возможно, что насос и/или детектор не отвечают требованиям. Используйте насос с минимумом пульсаций и детектор, у которого ячейка нечувствительна к изменениям показателя преломления и подходит для градиентных разделений¹.

Загрязненная ячейка детектора:

→ Очистить окна или заменить их².

Замена ультрафиолетовой лампы?

→ Нет, это помогает лишь в случаях, когда используются старые детекторы и однолучевые диодно-матричные детекторы. В современных детекторах самая распространенная причина неполадок — электроника, которую починить может только производитель.

Когда нужно заменять ультрафиолетовую лампу?

→ Это простой вопрос с непростым ответом. Многие производители современных ламп и детекторов рекомендуют заменять лампу после 5000–7000 ч работы. Если вы обнаружили, что лампа плохо работает на коротких длинах волн в УФ, то ее необходимо заменить. Ослабление излучения лампы с течением времени в коротковолновой области УФ происходит быстрее, чем в длинноволновой. Общее правило таково: чем раньше вы замените лампу — тем больше удовольствия вы доставите ее производителю. Если замените поздно, то можете получить неточные и даже неверные данные анализов.

26.6. Проблемы, связанные с формой пика

Отрицательные пики (см. также разделы 6.9 и 13.4)

Неподходящая подвижная фаза:

→ Образец был растворен или разбавлен в более прозрачном, чем подвижная фаза, растворителе при выбранной для анализа длине волны. Компоненты подвижной фазы не очень чисты или плохого качества.

¹ В современных аналитических насосах для ВЭЖХ пульсации сведены к минимуму электронным управлением. Кроме того, можно использовать для понижения пульсаций коммерчески доступные демпферы. Что же касается ячеек, нечувствительных к изменениям показателя преломления, то проще не искать их (вряд ли вы их найдете), а использовать другую длину волны или другой метод детектирования. — *Прим. пер.*

² Обычно современная ячейка у аналитического детектора (например, УФ, ДМД, по флуоресценции) неразборная, так что окна не получится заменить без замены ячейки. — *Прим. пер.*

Образец возбуждается монохроматическим светом и испускает флуоресцентное излучение:

→ Проверьте метод и измените его.

Уширение заднего фронта пика, слишком широкие и расщепленные пики

Старая или загрязненная колонка:

→ Проблема, особенно в случае расщепленных пиков, возникает из-за плохой колонки. Ее нужно заменить.

Внеколоночные объемы в системе:

→ Основные причины этих объемов — изношенные уплотнения роторов крапов, плохие соединения капилляров и капилляры со слишком большими внутренними диаметрами.

Ячейка детектора со слишком большим внутренним объемом¹:

→ На это обстоятельство надо обратить особое внимание при работе с малыми скоростями потоков и маленькими колонками. Необходимо использовать детектор с ячейкой малого внутреннего объема.

Слишком большой объем вводимого образца:

→ Это может привести к нелинейности, уширению пиков, уширению заднего фронта пиков и даже к порче колонки. Пересмотрите метод, который вы используете.

Фантомные пики (пики-призраки) (раздел 19.9)

Проявляются пики веществ, оставшихся после предыдущих инъектирований:

→ Слишком короткий промежуток между инъекциями. Увеличьте временной интервал. Неподходящий профиль градиента. Профиль, особенно в самом его конце, должен быть таким, чтобы все вещества, включая те, которые не представляют никакого интереса, и те, которые сильнее всех сорбируются, были вымыты из колонки.

Неизвестный пик каждый раз выходит в одно и то же время (удерживания):

→ Если пик становится меньше при каждом последующем холостом разделении, то это, скорее всего, перенос образца из предыдущего инъектирования. Принимаемые меры описаны в разделе «Перенос образца из предыдущего инъектирования». Если появляющийся пик примерно одной и той же величины, то это может быть инъекционный пик (системный пик). Исправить такую ситуацию может быть трудно или вовсе невозможно. Подвижная фаза не должна поглощать в рабочем диапазоне длин волн. Вполне возможно, что искомый пик просто исчезнет, если вы будете использовать подвижную фазу² из другой партии или другого производителя, особенно при работе на коротких длинах волн с использованием ацетонитрила или трифторуксусной кислоты. Воздух, попавший в колонку при нанесении образца, тоже может давать пик на хроматограмме³.

¹ Это также относится к внеколоночным объемам. — *Прим. пер.*

² Или компоненты, ее составляющие. — *Прим. пер.*

³ J. W. Dolan, D. H. Marchand and S. A. Cahill, *LC GC Int.*, **10**, 274 (1997) или *LC GC Mag.*, **15**, 328 (1997)



Слишком большие/маленькие пики

Неправильно приготовленный раствор образца. Слишком сильно/слабо разбавленный:

→ Проверьте раствор образца.

Некорректный ввод образца:

→ Проверьте работу автосамплера: тот ли объем образца, что был запрограммирован, введен. Проверьте, все ли правильно было сделано во время ручного ввода образца. См. также проверку объема вводимого образца в разделе «Плохая воспроизводимость ввода образца».

Неправильно установленный диапазон детектора. Выходной сигнал (в мВ) некорректно принимается блоком регистрации:

→ Проверьте установки детектора и систему обработки данных.

Не та длина волны:

→ Проверьте детектор и/или метод.

26.7. Неисправности при работе с детекторами светорассеивания

Большая¹ и неспецифическая чувствительность испарительных детекторов светорассеивания (ИДС) — самая большая западня этого метода. Ниже следуют наиболее часто встречающиеся проблемы, связанные с работой ИДС.

Слишком велико фоновое поглощение:

→ Подвижную фазу нужно проверить как можно тщательнее. Особенно воду, но, кроме нее, органические растворители. Они должны быть высокой чистоты. К сожалению, качества, достаточного для градиентного анализа, не всегда хватает для работы с ИДС. Даже стеклянные емкости могут быть причиной роста уровня фонового поглощения из-за ионов натрия. Соли не должны использоваться вовсе². Если без них нельзя обойтись, то их концентрация должна быть как можно меньше.

Линейность хуже, чем при использовании УФ-детектора:

→ Помните о том, что линейный диапазон у ИДС сравнительно мал. Если концентрации различных аналитов сильно различаются, необходимо произвести два или больше ввода образца с различными объемами таким образом, чтобы подобрать наиболее подходящие условия для количественного анализа. Зачастую коэффициенты усиления выходного сигнала нужно подбирать индивидуально. Если это возможно, то не изменяйте коэффициенты усиления в процессе анализа.

Известные и ожидаемые пики не видны:

→ Если соединения летучи или относительно летучи³, то часто необходимо понижать температуру в испарительной трубке. В зависимости от используемой

¹ По сравнению с рефрактометрическим детектором. — *Прим. пер.*

² Летучие соли использовать можно. — *Прим. пер.*

³ Анализируемые компоненты должны быть менее летучи, чем компоненты подвижной фазы, и быть достаточной концентрации. — *Прим. пер.*

модели ИДС, можно работать с водной подвижной фазой при 30 °С без избыточного роста фонового поглощения.

Невоспроизводимые результаты анализов:

→ Причины этого могут быть разные. Если такие причины, как неправильная работа автосамплера, исключены, то это может быть загрязнение или вовсе засорение трубки небулайзера.

→ Во многих случаях проблема может быть решена после промывки трубки небулайзера в ультразвуковой бане в течение нескольких минут. Иногда нужно увеличить или уменьшить давление газа, подаваемого в небулайзер.

Перенос образца из предыдущего инжектирования:

→ Две основные причины — нагревательная испарительная трубка и/или камера небулайзера. Камеру обычно очищают ершиком. Трубку можно нагреть до 100°С и, если повезет, за несколько минут все загрязнения разложатся. После охлаждения трубки до рабочей температуры нужно тщательно промыть подходящей для этого случая подвижной фазой¹.

26.8. Другие случаи

Враг хроматографиста — спешка:

→ Первому вводу образца должно предшествовать длительное уравнивание. После завершения работы промывайте систему достаточно долго, особенно если вы использовали до этого растворы солей.

Соли в подвижной фазе:

→ Лучше всего обойтись без них. К сожалению, во многих случаях это невозможно. Возможные меры: перед окончанием работы замените элюенты с солями на чистые растворители и промойте всю систему (включая дегазатор) в течение достаточно длительного времени². Если это невозможно, то необходимо поддерживать постоянный поток элюента через систему хотя бы на уровне 100 мкл/мин.

Профилактика и поддержание работоспособности:

→ Каждая хроматографическая система работает так хорошо, как хорошо за ней ухаживают. Некоторые профилактические меры не будут лишними: уплотнения насосов нужно менять через год или два³. Уплотнение в инжекторе автосамплера должно быть заменено не позже чем через 7000 инъекций

¹ Не мыть, а распылять через небулайзер подвижную фазу. Если природа загрязнений вам неизвестна, то в качестве элюента можно взять этанол или метанол. — *Прим. пер.*

² Правильнее будет промывать систему не в течение какого-либо времени, а ориентируясь на объем промывки. — *Прим. пер.*

³ Разумнее и правильнее заглянуть в руководство по обслуживанию того насоса, который у вас есть, и найти там то место, в котором написано, через какое количество прокачанных литров элюента необходимо поменять уплотнение плунжера насоса. — *Прим. пер.*



(если вы работаете с солевыми растворами, то через 3500 инъекций)¹. Меняйте плунжер шприца автосамплера ежегодно. Лампу УФ-детектора меняют после 4000–7000 ч работы. Вольфрамово-галогенную лампу для видимой области необходимо менять не позже чем через 2000–3000 ч работы². В противном случае она выйдет из строя (с нежелательными последствиями). Промывайте или заменяйте окна в ячейке детектора каждые два года³. Учтите, что этот срок может быть меньше и зависит от природы образцов, с которыми вы работаете.

26.9. Поверка хроматографической системы

→ Даже если ваша лаборатория не работает по правилам НЛП (GLP — Good Laboratory Practice, надлежащая лабораторная практика), рекомендуется проверять всю ВЭЖХ-систему через регулярные интервалы времени, используя валидированные стандартные операционные процедуры (СОП). Результаты должны быть задокументированы. Инструкции по этому вопросу можно найти в главе 25.

¹ Строго говоря, такие цифры лучше брать в инструкциях к самим приборам, где их пишут производители исходя не из общих соображений, а из конкретной статистики. — *Прим. пер.*

² См. предыдущее примечание переводчика.

³ Зачастую у современных ячеек это невозможно сделать, поскольку они неразборные. — *Прим. пер.*

ГЛАВА 27

ПРИЛОЖЕНИЕ 4: УПАКОВКА КОЛОНКИ¹

Качество упаковки колонки не является единственным решающим фактором, однако представляет собой одно из наиболее важных слагаемых, от которых зависит качество хроматографической системы.

Частицы сорбента диаметром меньше 20 мкм не могут быть эффективно упакованы в сухом виде, поскольку они слипаются в комки. Это обстоятельство не позволяет получить высокоэффективные колонки. Сорбент должен быть суспендирован в растворителе (в смеси растворителей) таким образом, чтобы получилась жидкая кашица. Эту кашицу с большой скоростью насос высокого давления перекачивает в колонку. Способов такой мокрой упаковки столько же, сколько производителей колонок. Те, кто продвигает эти способы, утверждают, что именно их способы самые лучшие, и делают все, чтобы затруднить дилетанту выбор между ними. Процесс приготовления суспензии основан на нескольких основополагающих принципах:

- а) Сухой порошок сорбента может быть суспендирован в жидкости равной плотности. Это предотвратит седиментацию. Такая процедура называется методом *сбалансированной плотности*². Седиментация разделяет сорбент по размеру частиц; в результате частицы большего размера будут осаждаться на дно, а те, что мельче, будут наверху, таким образом обеспечивается их разделение.

Поскольку плотность силикагеля около 2,2 г/см³, для приготовления суспензии нужно брать галогенированные углеводороды, такие как дибромметан (CH₂Br₂), перхлорэтилен (C₂Cl₄), четыреххлористый углерод (CCl₄) и диодметан (CH₂I₂).

Приготовление раствора для получения суспензии: 78 объемных частей дибромметана (d = 2,49 г/мл) и 22 объемные части диоксана (d = 1,03 г/мл) дают смесь плотностью 2,17 г/мл.

¹ Сухая упаковка, которая подходит для частиц больше 20 мкм, здесь не рассматривается. Однако в следующих работах можно найти исчерпывающую информацию по этому вопросу: L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2nd ed., 1979, p. 207; J. Klawiter, M. Kaminsky and J. S. Kowalczyk, *J. Chromatography*, **243**, 207 (1982).

² Определение плотности гранулированных твердых веществ было описано: F. Patat & K. Kirchner, *Praktikum der technischen Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, 4th ed., 1986, pp. 46, 47 (пикнометрический метод). Кроме этого руководства, методические указания могут быть найдены и в Интернете. Возможные затруднения: поры сорбента должны быть заполнены жидкостью!



- б) Для приготовления суспензии используется жидкость с высокой плотностью, такая как парафиновое масло или циклогексанол. Седimentация проходит относительно медленно. Недостаток этого метода заключается в том, что суспензия дает слишком большой перепад давления и ее невозможно перекачать насосом в колонку на большой скорости. Поэтому, чтобы понизить вязкость суспензии в процессе упаковки и уменьшить сопротивление потоку, частично упакованная колонна должна быть нагрета (например, с помощью водяной рубашки).
- в) Для приготовления суспензии может быть использован любой растворитель без учета их плотности и вязкости. Хорошие колонки получаются тогда, когда вы все делаете быстро. Если не указан конкретный растворитель, то перхлорэтилен с его высокой плотностью 1,61 г/мл хороший выбор (в нем частицы силикагеля диаметром 5 мкм осаждаются со скоростью всего 0,4 мм/мин). Также для приготовления суспензии можно использовать 0,01 М аммиачный раствор в воде, поскольку он благодаря электростатическому эффекту препятствует агрегации частиц.
- г) Резервуар для приготовления суспензии стоит снабдить магнитной мешалкой, которая в процессе упаковки колонки будет постоянно работать¹.

Пятипроцентную суспензию гомогенизируют в ультразвуковой бане. Более высокая концентрация будет, скорее всего, понижать достижимое число теоретических тарелок. Колонку стягивают болтами с предколонкой, которая тоже упаковывается, но не используется в процессе хроматографии, и все вместе привинчивается к стальному резервуару, заполняемому суспензией. Общий вид резервуара представлен на рис. 27.1

Резервуар наполняется суспензией и на него навинчивается крышка, через которую подается растворитель. Ни в одной из частей собранной подобным образом конструкции (колонка-предколонка-резервуар с суспензией) не должно быть воздуха. Крышку плотно привинчивают и соединяют капилляром с насосом. Последний должен работать с максимально возможной скоростью или создавать максимально возможное давление с момента включения. Колонка должна заполняться так быстро, как только это возможно, и под давлением, во много раз превышающим давление, при котором колонка будет работать (за исключением тех случаев, когда сорбент не абсолютно устойчив к высокому давлению, как, например, стиролдивинилбензолные матрицы, при работе с которыми надо следовать инструкции производителя). Колонку можно заполнить сверху вниз, а можно и в обратном направлении² (так, как это показано на рис. 27.2). Потом следует протестировать получившиеся колонки, чтобы выяснить, какой из вариантов привел к наибольшему числу теоретических тарелок. По соображениям техники безопасности собранная конструкция всегда должна быть вертикальной!

Чтобы избежать проседания сорбента в процессе работы колонки, следует после окончания процедуры упаковки промыть ее растворителем объемом 0,5 л при том же давлении, что и давление упаковки. Если суспензия содержит

¹ H. R. Linder, H. P. Keller and R. W. Frei, *J. Chromatogr. Sci.*, **14**, 234 (1976).

² P. A. Bristow, P. N. Brittain, C. M. Riley and B. R. Williamson, *J. Chromatogr.*, **131**, 57 (1977).

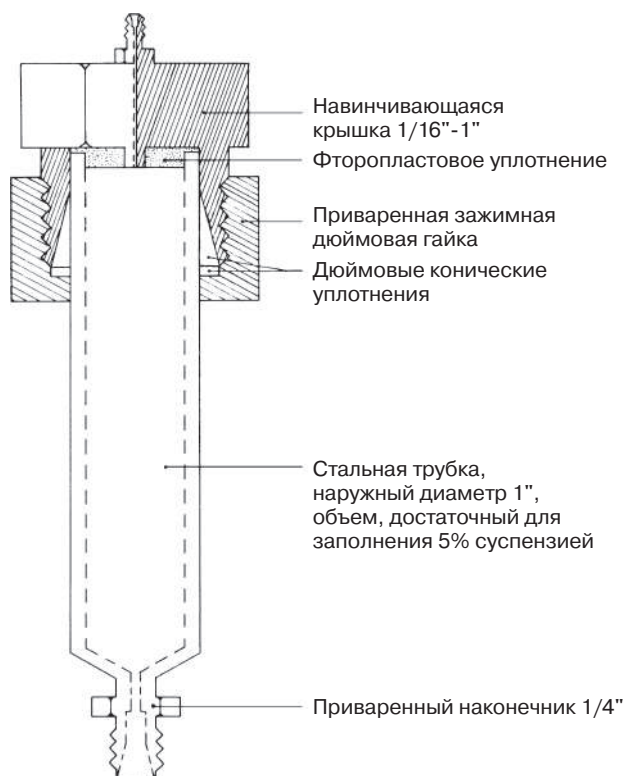


Рис. 27.1. Резервуар с суспензией для упаковки ВЭЖХ-колонок

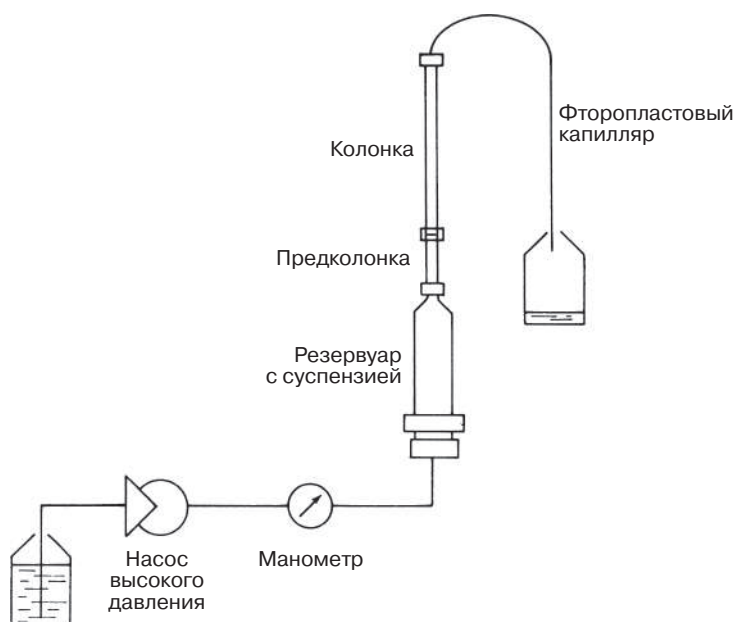


Рис. 27.2. Оборудование, необходимое для упаковки колонок



воду, то после упаковки силикагельная колонка должна быть последовательно промыта растворителями из элюотропного ряда (в частности, метанол → этилацетат → трет-бутилметилвый эфир → гексан). В конце процедуры упаковки колонку отвинчивают от предколонки или от резервуара для упаковки и присоединяют к хроматографической системе.

Метод упаковки силикагельных колонок

- а) Стационарную фазу¹ и жидкость, в которой она суспендирована (соотношение массы стационарной фазы и объема жидкости 5 %), гомогенизируют в ультразвуковой бане.
- б) Фильтр и концевое соединение фиксируют на колонке, запирают заглушкой, а другой стороной присоединяют к предколонке. С помощью большого шприца колонку и предколонку заполняют доверху жидкостью для приготовления суспензии. Для заполнения капилляров включают насос на короткое время.
- в) Резервуар для суспензии присоединяют к предколонке, суспензию заливают внутрь резервуара, доводят до самого верха жидкостью для приготовления суспензии и затягивают навинчивающуюся крышку с капилляром.
- г) Насос присоединяют к капилляру, идущему в резервуар, удаляют заглушку после колонки и вместо нее присоединяют фторопластовый капилляр. Насос включают сразу на максимальный расход.
- д) Через колонку прокачивают 0,5 л растворителя при максимально возможном давлении. Если упаковывают силикагель, то последовательно замещают растворитель на элюент, в котором потом будут работать. Для обращенно-фазовых колонок используют метанол.
- е) Насос выключают, колонку отсоединяют от предколонки и закрывают фильтром с концевым коннектором. В итоге ее присоединяют к хроматографической системе, но не к детектору. Перед этим колонку промывают/уравновешивают подвижной фазой.

¹ Если частицы стационарной фазы плохо отмучены или для упаковки используется уже регенерированный материал, рекомендуется самые мелкие частицы удалить седиментацией. Подходят для этих целей смеси диоксан-хлороформ (9:1) для силикагеля и диоксан-этанол (9:1) для обращенных фаз.

Указатель разделений

- N*-(1-фенилэтил) фталевая
кислота 318
- Азокрасители 41 (см. также 163)
- Алкалоиды 20, 194, 335, 339
- Алкены 174
- Аминокислоты 226, 252
- Амины, ароматические 54, 113, 214
- Анионы, неорганические 195, 283
- Антигипертензивные
препараты 335
- Антидепрессанты 129, 194
- Антиоксиданты 259
- Апельсиновый сок 233
- Ароматические соединения 54, 113,
125, 136, 151, 165, 174, 180, 182, 188,
196, 261, 264, 335
- Артемизии (полыни) экстракт 110
- Белки 127, 226, 239, 240, 269
- Белокопытника гибридного
(*Petasites hybridus*) экстракт 179
- Белокопытника экстракт 179
- Бензин 189
- Бензодиазепины 19
- Бромундекановая кислота 172
- Бупивакаин 293
- Валсартан 107
- Взрывчатые вещества 50, 289
- Вино 220
- Водорослевые пигменты 267
- Гамонил 128
- Глюкозиды 120, 171, 194, 257
- Горечавки экстракт (*Gentiana
ottonis*) 120
- Диастереомеры 169, 328
- Дождевая вода 220
- Желчные кислоты 332
- Зебуларин 197
- Иммуноглобулин 127, 239
- Исрадипин 342
- Каменноугольный пек 196
- Каротиноиды 170, 171
- Картофель экстракт 194
- Катехоламины 214
- Катионы, неорганические 208
- Кетокислоты 214
- Кислоты, органические 172, 205,
214, 220, 318, 332
- Кломипрамин 194
- Консерванты 151
- Кофе 20
- Кофеин 20
- Красный перец экстракт 170
- Лактальбумин фрагменты 42, 104
- Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) 240
- Лантаноиды 208
- Метопролол 328
- Молока белки 226
- Нитрилы 307, 308
- Норэфедрин 319
- Нуклеиновые кислоты 208, 209
- Нуклеотиды 184, 208
- Опиума алкалоиды 339
- Парабены (сложные эфиры пара-
гидроксibenзойной кислоты) 151
- Пептиды 42, 104, 187, 190, 315
- Пероксидаза 240
- Плазмида 209
- Плазмы крови экстракт 107, 197,
214, 328, 336
- Поверхностно-активные
вещества 193, 215
- Полистирол стандарты 231



- Полициклические ароматические углеводороды 192, 196
- Полиэфир 233
- Предшественник лекарственного соединения 139
- Производные аденина 184
- Пропранолол 324
- Растений экстракт 110, 120, 170, 171, 179, 194, 195, 267
- Салата кочанного экстракт 195
- Сахара 204
- Сахароспирты 204
- Спирты 169
- Стирол олигомеры 225
- Тестовая смесь 151, 165, 180, 335
- Тетрагидрофуран 233
- Тобрамицин 257
- Транквилизаторы 19, 187
- Триазинные гербициды 341
- Тритон 193
- Углеводы 204
- Фенолы 125, 136, 259, 261
- Фенотиазины 61
- Флавоны 259
- Фруктовый сок 233
- Хлорфенолы 136
- Циклоспорины 59
- Шафран экстракт 171

Предметный указатель

- α см. Коэффициент селективности
- AU, AUFS 102
- Carbon Peak 79
- H/u-кривая 34, 156
- P' (полярность) 178, 260
- Ultrapek 79
- Автосамплер 83
 неисправности 369
 тестирование 363
- Агароза 138
- Адсорбции изотерма 163
- Адсорбционная хроматография 161
 подвижная фаза 163
 приложения 170
 тестовая смесь 150
- Аккредитация 302
- Активированный силикагель 238
- Алюминия окись 137
- Аминофаза 133, 193
- Амперометрический детектор 108
 импульсный 109
- Анализ 270
 качественный 270
 количественный 276
 следовых количеств 272, 351
- Анализ микропримесей 272, 351
- Антиоксидант 73
- Аппаратуры (хроматографической системы) тест 353
- Асимметрия пиков 51, 54, 371
- Аттестация 300
- Аттестация оборудования (АО) 301
- Аффинная хроматография 236
 возможности элюции 237
 применение 239
- Ацетонитрил для ВЭЖХ 176
- Базовая линия проблемы 99, 288, 370
- БГТ (бутилгидрокситолуол) 73
- Безопасность 23
- Белковая ХНФ 320, 326
- Бинарная смесь 95, 165, 175
- Буферы 91, 201, 206
 летучие 94
- Валидация 296
- Ванкомициновая фаза 320, 326
- Ввод образца 81
 инжектор 81, 366
 объем 84, 273, 346
 объем в препаративной ВЭЖХ 309
 объем максимально допустимый 86, 273, 346
 проблемы 369
 техника 81, 83
- Ввод образца через мембрану 81
- Величины pK_a 93
- Виды разделений 20
- Влияние температуры 60, 266
- Внеколоночные объемы 50, 52
- Внешний стандарт 276
- Внутренний стандарт 276, 277
- Вода для ВЭЖХ 176
- Вода как дезактиватор 168
- Вода перегретая 340
- Возможности ВЭЖХ 60
- Вольфрамовая лампа 103
- Воспроизводимость 297
- Восстановление колонок 141



- Вращающееся уплотнение
 (ротора) 81, 369
- Время проскока 36, 148
 определение 148
- Время удерживания 35, 344
 проблемы 368
- Второй метод (проверка
 при валидации) 296
- Выбор метода 242
 в ОФ-ВЭЖХ 185
 смоделированный на компью-
 тере 266
 с четырьмя растворителями 260
- Выбор УФ-длины волны 103, 289
- Вырезание пиков 255
- Вырезание предпиков 255
- Вырезание целевой части хромато-
 граммы 255
- Высокоскоростная ВЭЖХ 333
- Высота теоретической тарелки 31,
 34, 40
 минимальная 34, 153, 155
 приведенная 152
- Вытеснительная хромато-
 графия 275, 314
- ВЭЖХ 18
 аналитическая 270
 виды разделений 20
 выбор метода 242
 высокоскоростная 333
 двумерная 255, 257
 капиллярная 330
 качественная 270
 количественная 275
 компьютерное моделирование 57,
 266
 микро 331
 на чипе 331
 ограничения 60
 оптимальные условия 60, 63
 оптимизация 167, 177, 247, 251,
 260, 263
 препаративная 305
 сверхкритическая 337
 сверхскоростная 333, 334
 с перегретой водой 340
 теория 29, 145, 343
 хроматографическая система 22
 электро 341
 энантиоселективная 316
- ВЭЖХ двумерная сравни-
 тельная 258
- ВЭЖХ-ИКФП 117
- ВЭЖХ-МС 117
- ВЭЖХ препаративной
 стоимость 307
- ВЖХ, сочетание со спектроско-
 пией 114
- ВЭЖХ-УФ 115
- ВЭЖХ-ЯМР 120
- ВЭТТ (высота, эквивалентная
 теоретической тарелке) 40
- Вязкость 72, 175
 единицы измерения 26
 таблица 88
- Газовая хроматография 24
- Гауссова форма пика 35, 43
- Гель-проникающая хромато-
 графия 232
- Гель-фильтрационная хромато-
 графия 232
- Гидроксилapatит 138
- Гидрофильных взаимодействий
 хроматография 196
- Гидрофобность 180
- Гидрофобных взаимодействий
 хроматография 189
- ГИХ (хроматография гидрофильных
 взаимодействий) 196

- Глубина посадки 80, 81
ГПС (гранулы с пористым слоем) 127
ГПХ (гель-проникающая хроматография) 232
Градиент 250
 на силикагеле 169
 на стороне высокого давления 76
 на стороне низкого давления 76
 при разделении макро-молекул 254
 профили 253
 разделение 250
 хроматографическая система 254
Градиент на стороне низкого давления 76
Градиент непрерывный 252
Градиентные системы 76
 тест 356
Градиентные системы высокого давления 76
Градиент растворителя 250
Градиент температуры 250, 341
Гранулы с пористым слоем 126
ГФХ (гель-фильтрационная хроматография) 232

Двумерная ВЭЖХ 255, 257
Двухколоночная ионная хроматография 218
Дегазация 74
Дезактиваторы 168
Действия по контролю качества 302
Дериватизация 290
 для разделения энантиомеров 320, 327
 до диастереомеров 327
Детектирование
 комплексное 112
 непрямое 114

Детектор
 линейность 100
 перегрузка 311
 постоянная времени 54, 100, 288, 347
 свойства 97
 селективность 98
 тестирование 361
 требования 97
 чувствительность 97
 шум 98, 288, 361, 370
Детектор радиоактивности 112
Детектор светорассеяния 109
 проблемы 373
Детектор фотопроводимости 111
Детекторы 97
 амперометрические 108
 амперометрические, импульсные 109
 диодно-матричные 115
 инфракрасные 111
 кондуктометрические 111
 кулонометрические 109
 масс-спектрометрические 117
 МС/МС 120
 общие свойства 98
 показатель преломления 104
 поляризметрические 317
 радиоактивности 112
 реакторы для постколоночной дериватизации 290
 светорассеяния 109
 УФ (ультрафиолет) 102, 361
 флуоресцентные 106, 112
 флуоресцентные, лазерно-индуцированные 112
 фотопроводимости 111
 чувствительность к концентрации 97
 чувствительность к массе 97



- электрохимические 108
ЯМР (ядерный магнитный резонанс) 120
Детекторы с фиксированной длиной волны 104
Диаграмма Ишикавы 299
Диаграмма контрольная 302
Диаграмма (моделирование условий хроматографии) 266
Диапазон линейности (сигнала детектора) 100
Диастереомеры 170, 327
Диодно-матричный детектор 115
Диольная фаза 133, 192
Дипольный момент растворителей 87
Дисперсия 50
Диффузия 31, 32, 158
Диффузия, коэффициент 156
макромолекул 159
Диффузия турбулентная 31
Длина волны детектирования 103, 288
Длина колонки, оптимизированной по давлению 60
ДНБФГ (динитробензоил-фенилглицин)-фаза, сорбент Пиркла 320, 321
Добавки к подвижной фазе 54, 73, 93, 168, 179, 206, 232
Достоверность 295, 297
Дрейф 99, 288, 370
Единицы давления 26
Единицы измерения длины 26
Журналы 27
Значение k см. Коэффициент удерживания
Значение параметра S 254
ИДС (испарительный детектор светорассеяния) 109
проблемы 373
Извлечение (анализируемого вещества в образце) 281, 297
Изогнутый капилляр (реактор для дериватизации) 291
Изократическое разделение 242, 249
Изотерма Ленгмюра 163
ИК-детектор 111
ИКФП (инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием) 117
Иммуноаффинная хроматография 241
Импульсное амперометрическое детектирование 109
Индекс разделения пиков 38
Инжектор 81
воспроизводимость 363
тест 363
Интегрирования порог 288
Интерферометр 105
Инфракрасный детектор 111
Ионизация 117
Ионизация химическая 117
Ионизация электрораспылением при атмосферном давлении 118
Ионизация электропреем 118
Ионная сила 92, 206
Ионная хроматография 216
область применения 220
подвижные и неподвижные фазы 218
Ионное равновесие 201

- Ионообменная хроматография 198
 количество образца 205
 подвижная фаза 201, 205
 практические приложения 207
- Ионообменники 136, 199
 аббревиатуры 200
 емкость 199
 изменение ионной формы 207
- Ион-парная хроматография 210
 область применения 213
 противоион 211
- Ион-эксклюзионная хроматография 204
- ИРП (индекс разделения пиков) 38
- Исключение (из пор сорбента) 221
- Испарительный детектор светорас-
 сеяния 109
- ИЭР 118
- ИЭРАД (ионизация электро-
 спылением при атмосферном
 давлении) 118
- Калибровка 276
 в ГПХ 224
 методы 276
- Калибровочный график 276, 279
 в ГПХ 225
 ошибки 279
- Калькулятор смесей элюентов 95
- Капилляры 77
 максимально допустимая
 длина 77, 348
 обрезка 79
 перепад давления 78
- Картридж 122
- Качественный анализ 270
- Кипения точка, таблица 88
- Кислотность растворителей 177
- Клапан 67
- Книги 27
- Количественный анализ 276
 калибровка 276
- Количество образца 86
 в анализе микропримесей 273
 в ИОХ 205
- Колонка 121
 безразмерные параметры 152
 варианты конструкций 122
 диаметр 121, 123, 273, 344, 349
 коэффициент соответствия 181
 микро 331
 направление потока 144
 опорожнение 143
 оптимизация давления 60
 переключение 255, 257
 перепад давления 146, 153, 158,
 351
 поглотитель 124
 предколонка 124
 проницаемость 146, 153
 процедура упаковки 376
 регенерация 141
 соединение 47, 230, 255, 257, 268
 термостатирование, тест 363
 тесты 145, 150
 уход 141
- Колонка-поглотитель 123
- Колонка-реактор 291
- Колонки бимодальные 230
- Колонки соединенные 47, 230, 255,
 257, 268
- Колонок переключение 255
- Колонок упаковка *см. Фаза*
 неподвижная
- Комплексное детектирование 112
- Компьютерное моделирование
 разделения 57, 266
- Кондуктометрический детектор 111
- Контрольная диаграмма каче-
 ства 302



- Концентрация в максимуме пика 272, 274, 349
- Короткоходовый плунжерный насос 66
- Коррозия 73
- Кофеин анализ 19
- Коэффициент емкости *см.* Коэффициент удерживания
- Коэффициент относительного удерживания *см.* Коэффициент селективности
- Коэффициент распределения 29, 37, 163
- Коэффициент селективности 38, 45
- Коэффициент удерживания 30, 37, 47
- Кран (инжектор) 81, 366
- Кран (насос) 67
- Краун-эфирные компоненты неподвижных фаз 322, 325
- Кремнекислый магний 137
- Кривая Ван-Деемтера 34, 155, 156 в эксклюзионной хроматографии 223
- Круговой дихроизм 317
- Кулонометрический детектор 109
- Лазерно-индуцированная флуоресценция 112
- Лампа 103
вольфрамовая 103
дейтериевая 103
замена 370, 371
кадмиевая 104
ртутная 104
цинковая 104
- Лампа дейтериевая 103
- Лампа кадмиевая 104
- Лектины 239
- Лигандообменная ХНФ 323, 326
- Лигандообменная хроматография 203
- Линейная скорость потока 36, 148, 344
оптимальная 34, 156
- Линейность калибровочной кривой 296
- Локализация 164
- Макромолекулы 130, 159, 227, 234, 254
- Масса образца 53, 85
- Массоперенос 33
- Масс-спектрометрия 117
- Масштабирование 305
- Межлабораторные испытания 302
- Мембранный насос 71
- Мертвое время 36, 148, 344
- Мертвые объемы 50, 52
- Мертвый объем 36, 224, 343
- Метакрилатный гель 138
- Метанол для ВЭЖХ 176
- Метод
валидация 296
выбор 242
оптимизация 246
перенос 246
селективность 296
устойчивость 266, 297
- Метода выбор 242
- Метод моментов 39
- Микро-ВЭЖХ 330
- Микроколлонка 331
- МИП (молекулярно импринтированный полимер) 327
- Многомерная хроматография 255, 257
- Модификаторы подвижной фазы (НФ-ВЭЖХ) 168
- Молекулярно импринтированный полимер 327

Монолитная фаза 128

МС 117

МС/МС 120

Направление потока 144

Направленная оптимизация 264

Насос 66

клапан 67

короткоходовый плунжерный 66

мембрана 71

обслуживание 69

пневматический усилитель 71

протечка 367

тестирование 357

требования 66, 358

уплотнение 69, 70

шприцевого типа 71

Насос с пневматическим

усилителем 71

Неисправности 366

Неожиданные пики 292

Неподвижная фаза 29, 124

выбор 243

ГПС 127

для ионной хроматографии 219

для обращенно-фазовой хромато-
графии 180

для оснований 184, 185

задачи 243

конфигурация 177

коэффициент соответствия

колонок 181

меры предосторожности 23, 141

микрофотографии 128, 134

монолитные 128

непористые 126

ограниченный доступ 140

основные свойства 124

перфузионные 127

поверхностно-пористые 126

пористые 126

регенерация 141

смешанные 266

температурная стабильность 60

химическая стабильность 130,
133, 186

хиральная 320

Непористая стационарная фаза 126

Непрямое детектирование 114

Непрямое разделение энантиоме-
ров 327

Нитрильная фаза 133, 193

Нитрофаза 133, 195

Нормальнофазная ВЭЖХ *см.* Ад-
сорбционная хроматография

ОА (операционная аттестация) 301

Обеспечение качества 295

Обогащение образца 275

Обращенно-фазовая хроматогра-
фия 173

коэффициент соответствия

колонок 181

подвижная фаза 175, 176

приложения 186

разработка метода 185

сорбенты 180

тестовая смесь 151

Общая пористость 148

Объем задержки 77

Объем образца 84, 273, 346

в препаративной ВЭЖХ 309

максимально допустимый 273,
346

Объем пор в эксклюзионной
хроматографии 224

Объем удерживания 36, 345

Одноколоночная ионная
хроматография 217

ОДС (октадецилсилан) 132, 173



- Оксид титана 139
Оксид циркония 140
Октадецилсилан 132, 173
Операционная аттестация 301
Определение молекулярной массы 227
Оптимальные параметры 60
Оптимизация 167, 177, 247, 251, 260, 263
 принцип оптимизации 263
Оптимизация разделения 263
Оптимизация разделения
 с помощью четырех растворителей 260
Отрицательные пики 114, 292, 371
Ошибки интегрирования 284, 287
- Параметры безразмерные 152
ПГУ (пористый графитированный углерод) 138
Перегретая вода 340
Перегрузка 52, 274, 309
Перегрузка по массе 52, 310
Перегрузка по объему 309, 346
Перекрывающие пики 284
Перенос методики 246
Перенос образца в следующий анализ 84, 363, 369
Перепад давления в капиллярах 78, 366
Перепад давления в колонке 146, 153, 158, 351
Перфузионные частицы 127
Петля крана-инжектора 81
Пик 35, 43
 асимметрия 51, 54, 146, 372
 высота 274, 284, 288
 геометрия колонки 349
 двойной 372
 изображения 42
 неожиданные 292
 объем 345
 отрицательные 114, 292, 371
 ошибки 284, 286
 перекрытие 284
 площади стандартное отклонение 301
 площадь 284
 призраки 102, 251, 271, 292, 372
 ширина 36, 39, 345
Пики-призраки 102, 251, 271, 292, 372
Пиковая емкость 55, 64, 345
ПКО (предел количественного определения) 279, 297
Площадь поверхности, удельная 217
ПО (предел обнаружения) 280, 297
Повторяемость 297
 автосамплера 363
Поглощение 102, 350
Поглощения единица 102
Погрешность измерения 299
Погрешность постоянная систематическая 279
Подавление фоновой проводимости 216
Подвижная фаза 29
 выбор 72, 167, 177, 231
 вязкость 87, 175
 дегазация 74
 добавки 54, 73, 93, 168, 179, 206, 232
 калькулятор смесей элюентов 95
 нагрев в колонке 60
 оптимизация в НФ-ВЭЖХ 167
 оптимизация в ОФ-ВЭЖХ 177
 приготовление 74
 сверхкритическая 337
 свойства 72, 87

- селективность 90, 164, 177
сжимаемость 25
смешиваемость 91
срок годности 94
таблица 88
хиральная 318
чистота 73, 312
элюирующая сила 47, 87, 164, 177
- Подтверждение вторым методом 296
- Полистирол 135
- Полиэфирэфиркетон 79
- Полное проникновение (молекул образца в сорбент) 221
- Полые фазы ТХНФ 322, 325
- Поляриметр 317
- Полярность 20
- Пористое стекло 137
- Пористость 148
- Пористый графитированный углерод 138
- Порог интегрирования 288
- Поры 126, 130, 136
- Последовательная оптимизация 263
- Постколоночная дериватизация 290
- Постоянная времени 54, 100, 288, 347
- Предел количественного определения 279, 297
- Предел обнаружения 98, 280, 297, 350
- Предел УФ-прозрачности 87
таблица 88
тестирование УФ-детектора 361
УФ-лампы 103
- Предколонка 124
- Предколоники 123
- Предколоночная дериватизация 290
- Препаративная ВЭЖХ 305
- Приведенная высота теоретической тарелки 152
- Приведенная скорость 152
- Приготовление образца 84
- Проблемы с давлением 366
- Проблемы элюции общие 249
- Продольная диффузия 32
- Промежуточный объем (жидкости между частицами стационарной фазы) 224
- Проникновение полное (аналита в поры сорбента) 221
- Проницаемость (сорбента) 146, 153
- Пропорциональная систематическая погрешность 279
- Противоионы 211
- Процесс разделения 30
оптимизация 247
- ПЭЭК (полиэфирэфиркетон) 79
- Рабочий диапазон 297
- Разбавления коэффициент 348
- Разброс пор по диаметру 130
- Размер частиц 32, 125, 349
определение 147
распределение 125
- Размывание заднего фронта пика 51, 53, 55, 146, 372
- Размывание зоны 31
- Размывание переднего фронта пика 51, 54
- Разрешение 38, 41, 45
вероятность 55
уравнение 45
- Распределение потока 32
- Распределительная хроматография 203



- Растворители, основность 90, 167
- Растворитель 87
- для образца 85, 280
 - для образца, в препаративной ВЭЖХ 311
 - емкости для растворителей 75
 - селективность 90, 164, 177
 - смешиваемость 91
 - таблица 88
 - элюирующая сила 47, 87, 164, 177
- Растворитель А 91
- Растворитель Б 91
- и высота пика 284
- Раствор образца 85, 280
- Реактор капиллярный 291
- Рефрактометр 105
- Рефрактометрический
- детектор 105
 - пик, связанный с изменением показателя преломления 271
 - таблица показателя преломления 88
- Рефрактометрический детектор 105
- Рефрактометр отклоняющий 105
- Рехроматография 313
- Ртутная лампа 104
- Сбалансированной плотности
- метод 376
- Сбор фракций 312
- Сверхкритическая ВЭЖХ 337
- Сверхскоростная ВЭЖХ 333, 334
- СДВБ (стиролдивинилбензол) 135
- Сдвоенные пики 372
- Сегментированное устройство (реактор для дериватизации) 291
- Селективность 38, 45, 90
- детектора 98
 - длины волны 103, 289
 - метода 296
 - подвижной фазы 91, 164, 177
- Селективность длины волны 103, 289
- Сертификация 302
- Сжимаемость 25
- Силанольная активность 181
- Силанольная группа 129, 161
- Силикагель 129, 161
- забуференный 171
 - химически привитый 131
- Силикагель химически модифицированный 131, 192
- Силоксановая группа 130
- Симплекс-метод 264
- Системные пики 114, 215, 292, 372
- Скорость потока 33, 36, 148, 344
- оптимум 34, 156, 344
 - приведенная 152, 344
- Скорость, приведенная 152
- СКП (стекло с контролируемым размером пор) 137
- Смешанные сорбенты 266
- Смешиваемость 91
- Сокращенная хроматограмма 49
- Сольватохромные параметры 90
- Соотношение S/N (сигнал/шум) 98
- Соотношение сигнал/шум 98
- СОП (стандартные операционные процедуры) 298
- Соппротивление потоку 146
- безразмерное 153
 - в капиллярах 78
- Соппротивление разделению 153, 157
- Сорбенты на основе стекла 137
- Спейсерная группа 238
- Спектральной полосы ширина 104
- Спектроскопия, детектирование
- в сочетании со спектроскопией 114

- Специфичность метода 296
Спиральный полимер ТНКФ 321, 325
Способы подавления (фоновой проводимости) 216
Срок годности элюентов 94
Стандарт, внешний 276
Стандарт, внутренний 277
Стандартная операционная процедура 298
Статистическая вероятность разрешения 55
Статистическое оформление экспериментов 297
Стеклянные сорбенты с контролируемым размером пор 137
Стиролдивинилбензол 135
Структура пор 33, 126, 127, 136
 в монолитных фазах 128
 в фазах с ограниченным доступом к поверхности 140
 перфузионной частицы 127
 стирол-дивинилбензола 136
Ступенчатый градиент 251
Суперкритическая флюидная хроматография 337
СФХ (сверхкритическая флюидная хроматография) 337

Тарелка *см.* Теоретическая тарелка
Теоретическая тарелка 31
Теория 29, 145, 343
Тестирование колонок 145, 150
 в эксклюзионной хроматографии 228, 229
Тестирование оборудования 353
Тест на пригодность системы 301
Тестовая смесь 150
Тестовый градиент 250
Тетрагидрофуран для ВЭЖХ 176

Тонкослойная хроматография 167
Точка перегиба 38
Точность 295, 297
Точность установки длины волны 361
ТПС (тесты на пригодность системы) 301
Треугольник селективности 91, 177, 260
Трифторуксусная кислота 93
Трубки *см.* Капилляры
ТСХ-тест 167
ТХНФ (твердые хиральные неподвижные фазы) 320

УА (установочная аттестация) 301
Увеличение температуры 60
УВЭЖХ 336
Углерод графитированный 138
Удельная площадь поверхности 130
Удельная проницаемость 146
Удельное разрешение в эксклюзионной хроматографии 229
Упаковка колонок 376
Уплотнение плунжера 69, 367
Уравнение Ван-Деемтера 154
Уравнение Козени – Кармана 147
Уравнение Нокса 155, 156
Уравнение Уилки – Чанга 158
Уравнение Хагена – Пуазейля 78
Установочная аттестация 301
Устойчивость (метода) 266, 297
Утечки 367, 368

Фаза Пиркла 320
Фазовая диаграмма 338
Фазы подвижные хиральные 318
Фазы полые хиральные 322, 325
Фазы привитые 130, 192
 таблица 133
 химическая стабильность 133, 186



- Фазы привитые химически модифицированные 130, 192
стабильность 133, 186
- Фазы с ограниченным доступом к поверхности 140
- Фазы хиральные неподвижные 320
жидкие 319
таблица 321
- Фазы хиральные неподвижные жидкие 319
- Фазы щеточного типа 132
- Фазы щеточного типа ТНКФ 320, 321
- Фактическое время удерживания 36
- Ферулы 80
- Фитинги 79
- Флуоресцентный детектор 106
с лазерно-индуцированной флуоресценцией 112
- Форма пика 35, 42
проблемы 371
с МС-детектированием 35
- Фрит (фильтр) 122
- Фунгициды 207
- Фунт на квадратный дюйм 26
- ХИАД (химическая ионизация при атмосферном давлении) 117
- Химическая ионизация при атмосферном давлении 117
- Химическая стабильность привитых фаз 133, 186
- Химическое подавление (фоновой проводимости) 218
- Химическое размывание заднего фронта пика 53
- Хиральное разделение *см.* Энантиомеров разделение
- Хиральные фазы с макроциклическими антибиотиками 323, 326
- Хроматограмма 35
сгенерированная из случайных чисел 57
сокращенная 49
- Хроматографическая система 22
тестирование 353
- Хроматография
определение 29
процессы 30
- Хроматография на привитых фазах 192
- Целлюлозы производные 321, 325
- Цианофаза 133, 193
- Цибакрон голубой 239
- Циклодекстриновые компоненты неподвижных фаз 322, 325
- Цилиндрической поры модель 222
- Цинковая лампа 104
- Число теоретических тарелок 39, 46, 145, 343
- Чувствительность 100
- Чувствительность детектора 97
- Чувствительность к концентрации 97
- Чувствительность к массе 97
- Шестипортовый кран 81
- Ширина поры 130
- Шум 98, 288, 361, 370
- ЭА (эксплуатационная аттестация) 301
- Эксклюзионная хроматография 221
калибровка 224

- определение молекулярной массы 227
приложения 232
с несколькими колонками 230
удельное разрешение 229
фазовые системы 231
Эксплуатационная аттестация 301
Экспоненциально модифицированная Гауссова функция 55
Электронное подавление (фоновой проводимости) 216
Электрофорез капиллярный 25
Электрохимический детектор 108
Электрочроматография 341
Элюент. *см.* Подвижная (мобильная) фаза
Элюотропные ряды 88, 164
Элюции проблемы 249
ЭМГ (экспоненциально модифицированная Гауссова функция) 55
Энантиомеров разделение 316
диастереомеров 327
непрямое 327
Эндкепирование 132, 181
Эффективность колонки 153
ЯМР (ядерный магнитный резонанс) 120
Ячейка детектора, объем 101, 347
максимально допустимый 347

Производство книг на заказ
Издательство «ТЕХНОСФЕРА»
125319, Москва, а/я 91
тел.: (495) 234-01-10
e-mail: knigi@technosphere.ru

Реклама в книгах:

- модульная
- статьи

Подробная информация о книгах на сайте
<http://www.technosphere.ru>

Вероника Р. Майер

Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография

Перевод – Иван Алексеевич Петухов,
Ольга Александровна Петухова, Сэсэгма Бимбаевна Гомбоева,
Алексей Андреевич Богомолов, Валерий Михайлович Бару,
Михаил Борисович Бару
под общей редакцией
к.т.н. М.Б. Бару

Редактор – И.В. Важенина
Компьютерная верстка – С.С. Бегунов
Дизайн книжных серий – С.Ю. Биричев
Дизайн – Н.И. Семячкина
Корректор – О.Ч. Кохановская
Выпускающий редактор – С.Ю. Афанасьева
Ответственный за выпуск – С.А. Орлов

Подписано в печать 30.03.2017
Формат 70×100/16. Печать офсетная
Гарнитура «Ньютон»
Печ.л. 25,5. Тираж 1000 экз. (1-й завод 300 экз.). Зак. № D-2120
Бумага офсет №1, плотность 80 г/м²

Издательство «ТЕХНОСФЕРА»
Москва, ул. Краснопролетарская, д.16, стр.2

Отпечатано в ООО «Красногорская типография»
143405, Московская обл, Красногорский р-н,
Красногорск г, Коммунальный кв-л, дом № 2