

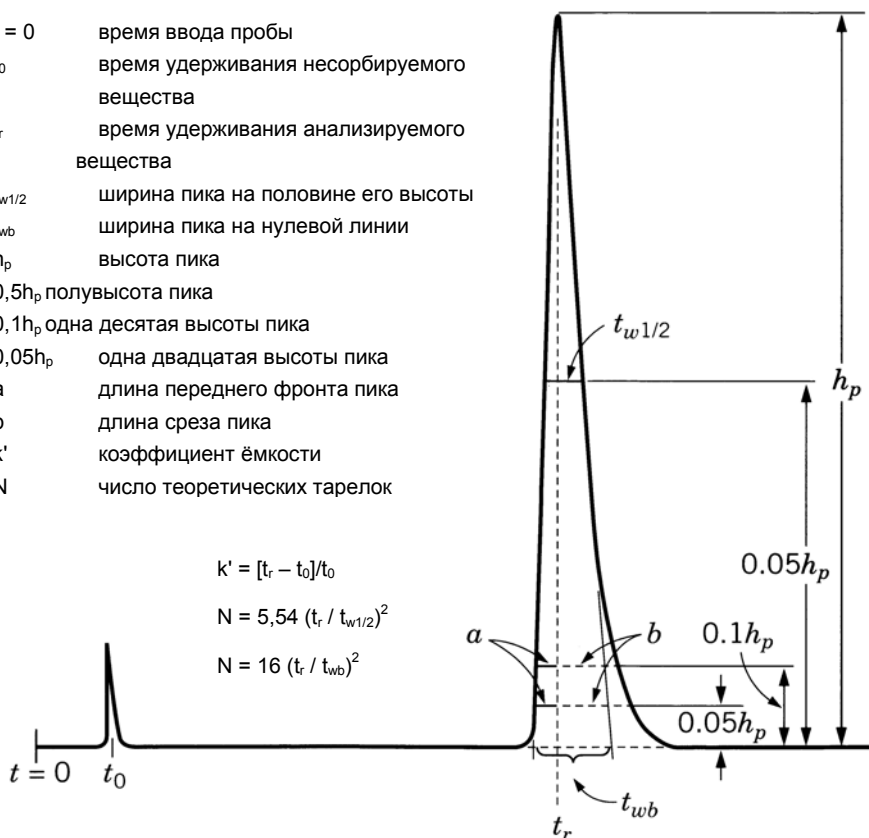
КАК ИЗБЕЖАТЬ ОШИБОК В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

ЛАБОРАТОРНОЕ ПОСОБИЕ

Пол С. Садек

Величины, обычно определяемые по хроматограммам

$t = 0$	время ввода пробы
t_0	время удерживания несорбируемого вещества
t_r	время удерживания анализируемого вещества
$t_{w1/2}$	ширина пика на половине его высоты
t_{wb}	ширина пика на нулевой линии
h_p	высота пика
$0,5h_p$	полувысота пика
$0,1h_p$	одна десятая высоты пика
$0,05h_p$	одна двадцатая высоты пика
a	длина переднего фронта пика
b	длина среза пика
k'	коэффициент ёмкости
N	число теоретических тарелок



H	высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)
L	длина колонки
d_p	диаметр зерна
h	приведенная высота тарелки
A_{10}	коэффициент асимметрии пика на одной десятой высоты (также $A_{0,1}$)
T	коэффициент удлинения среза пика (на одной двадцатой высоты, в соответствии с Фармакопеей США)

$$H = N / L$$

$$h = H / d_p$$

$$A_x = b_x / a_x,$$

где x – высота

$$T = (a + b) / 2a,$$

(на $0,05$ высоты пика)

КАК ИЗБЕЖАТЬ ОШИБОК В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

КАК ИЗБЕЖАТЬ ОШИБОК В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Пол С. Садек

Главным в моей жизни людям:
Тамми, Джефри, Бекки, Чарльзу и Джоанне

ВВЕДЕНИЕ	1
1 КОМПОНЕНТЫ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ВЭЖХ	9
1.1 Аппаратура для ВЭЖХ	9
2 ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ, ПАРАМЕТРЫ, ПЕРЕМЕННЫЕ И ТЕОРИЯ	47
2.1 Процесс разделения, образование пиков, получение хроматограммы	47
2.2 Параметры, используемые для описания хроматограмм	51
2.2.А Основные уравнения, описывающие образование хроматографического пика и хроматографическое разделение	60
2.3 Обзор приёмов разработки и оптимизации методик	67
2.3.А Элюотропные ряды и сила элюента	67
2.3.Б Треугольные диаграммы элюентов	71
2.3.В Оконные диаграммы	72
2.3.Г. Пробные градиенты	73
2.4 Линейность, чувствительность, предел обнаружения, отношение сигнал-шум и пригодность системы	74
2.4.А Линейность	75
2.4.Б Чувствительность	77
2.4.В Предел обнаружения	77
2.4.Г Отношение сигнал-шум	77
2.4.Д Коэффициент отклика	80
2.4.Е Разработка методики	81
2.4.Ж Валидация и документирование методики	82
2.4.И Документация по описанию стандартной операционной процедуры (СОП)	83
2.4.К Пригодность хроматографической системы	83
2.4.Л Устойчивость и выносливость методики	84

СОДЕРЖАНИЕ

2.5	Обзор вариантов хроматографического разделения	85
2.5.A	Нормально-фазная хроматография	85
2.5.B	Обращённо-фазная привитофазная хромато- графия	96
2.5.B	Ион-парная хроматография	104
2.5.Г	Ионообменная хроматография	108
2.5.Д	Афинная хроматография	117
2.4.E	Хиральная хроматография	119
2.5.Ж	Эксклюзионная хроматография	122
3	ОБНАРУЖЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНО- СТЕЙ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ВЭЖХ	133
	Профессиональный набор инструментов	133
	Введение. Обеспечение штатного режима ВЭЖХ	135
3.1	Растворители и элюенты	137
3.1.A	Граница пропускания в УФ диапазоне	140
3.1.B	Спектральная зависимость коэффициента поглощения растворителей	144
3.1.B	Фоновый сигнал от растворителя	152
3.1.Г	Вязкость элюента	163
3.1.Д	Смешиваемость и растворимость	169
3.1.E	Неустойчивость и реакционная активность растворителей	183
3.1.Ж	Микрочастицы в растворителях	199
3.2	Подвижные фазы	200
3.2.A	Фильтрование растворителей	200
3.2.B	Приготовление подвижной фазы	204
3.2.B	Дегазация растворителя	211
3.3	Резервуары	215
3.4	Входные фильтры и дегазаторы	224
3.5	Блок насосов	229
3.5.A	Обратные клапаны	229
3.6	Насыщающие предколонки и проходные фильтры	240

3.7	Подготовка и хранение проб и стандартов	244
3.8	Инжекторы	259
3.8.A	Шприцы	260
3.8.B	Ручные инжекторы	263
3.8.B	Автоматические инжекторы	266
3.9	Колонки	271
3.9.A	Механизмы удерживания в ВЭЖХ	272
3.9.B	Монтаж и эксплуатация колонок	274
3.10	Соединительные трубопроводы	297
3.11	Детекторы	306
3.11.A	Спектрофотометрические детекторы ультрафиолетового и видимого диапазонов (УФВ)	306
3.11.B	Рефрактометрические детекторы	310
3.11.B	Флуориметрические детекторы	314
3.11.Г	Вопросы, общие для всех детекторов	315
3.12	Текущий контроль показателей системы и график регламентных профилактических работ	320
3.12.A	Валидация системы и параметры пригодности	321
3.12.B	Валидация методик	324
3.12.B	Текущий контроль показателей системы	326
3.12.Г	График регламентных профилактических работ	329
УКАЗАТЕЛЬ ТЕРМИНОВ		335
Англо-русский указатель терминов		377
ПРИЛОЖЕНИЕ. Таблицы основных свойств материалов для хроматографии		397
НЕИСПРАВНОСТИ И ИХ УСТРАНЕНИЕ. Краткая справка		415
АЛФАВИТНО-ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ		423

ПРЕДИСЛОВИЕ

Эта книга предназначена и специально написана для химиков-аналитиков, не знакомых или не имеющих достаточного опыта работы с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), если угодно, это – лабораторное пособие. Она рассчитана на использование в лаборатории, рядом с приборами. Книга даже сшита спиралью, чтобы удобнее было разворачивать на столе. Содержание книги изложено в логической последовательности: порядок разделов воспроизводит порядок прохождения подвижной фазы по компонентам хроматографической системы – от флаконов с элюентами до детектора.

В начале (глава 1) дано подробное описание аппаратуры для ВЭЖХ и широкого спектра дополнительных приспособлений. Описаны назначение каждого компонента, его место в системе и работа. В главе 2 очень детально представлены общие параметры, используемые при определении рабочих характеристик ВЭЖХ-системы. Кроме того, в главе 2 конспективно рассмотрены различные варианты ВЭЖХ (например, обращённо-фазная, хиральная, эксклюзионная). Эти главы являются вводными по отношению к главе 3.

В главе 3 показано, с какими нештатными ситуациями может встретиться хроматографист (например, с возникновением нестабильности потока или повышением давления) и чем именно они могут быть обусловлены. Далее объясняется, как выявить и устранить неисправность. Заключительная часть главы 3 посвящена планированию профилактических регламентных работ. Именно они дают возможность предупредить нештатные ситуации. Каждый хроматограф должен быть снабжён планом профилактических регламентных работ, который надлежит неукоснительно выполнять.

В книге нет ни детального изложения основ теории, ни пространных рассуждений о вариантах применения, ни многословных прений о разработке и оптимизации методик. Эти вопросы никак не связаны с обнаружением и устранением распространённых неполадок.

Надеемся, что книга избавит аналитиков от напрасных трат времени, помогая быстро выявить и устранить причины нештатных ситуаций, к сожалению, то и дело встречающихся в повседневной работе с хроматографом.

Пол С. Садек

Гранд-Рапидс, штат Мичиган

КАК ИЗБЕЖАТЬ ОШИБОК В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

За последние 25 лет высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) стала одним из основных методов анализа, используемым в трёх из каждых четырёх аналитических лабораторий. Причин этому, по меньшей мере, шесть.

Во-первых, невероятно выросло количество детекторов, которые можно использовать в жидкостной хроматографии (ЖХ). Вначале применялись только ультрафиолетовый (УФ) детектор с фиксированной длиной волны и рефрактометр. Теперь же широко применяются диодно-матричный детектор (детектор с матрицей фотодиодов), испарительный нефелометрический, сканирующий флуориметрический, электрохимический, кондуктометрический и масс-спектрометрический детекторы. Требования снижения предела обнаружения и повышения чувствительности вызвали к жизни непрерывное улучшение параметров этих детекторов. К тому же, улучшились надёжность работы и устойчивость этих детекторов к внешним воздействиям.

Одновременно проходила компьютеризация средств управления хроматографическими системами, они становились всё более удобными в пользовании. Росли возможности сбора и обработки данных. Главной движущей силой повсеместного применения этих средств стал прогресс вычислительной техники. При совсем небольших затратах можно накапливать огромные количества данных, анализировать результаты каждого опыта, быстро получать статистические и сравнительные совокупности данных, печатать подробный отчёт или сжатую сводку результатов.

Во-вторых, были значительно усовершенствованы насосные системы – в отношении диапазона скоростей потока, воспроизводимости и надёжности. Насосы развивают более высокое давление, что позволяет использовать элюенты в более широком диапазоне вязкостей. Применение градиентных систем, позволяющих задавать многоступенчатый и нелинейный профили и использовать смеси от двух до шести, и даже более, составляющих стало нормой. Воспроизводимость работы насосов обеспечивает подачу подвижной фазы в диапазоне скоростей от 1 мкл/мин до 5 мл/мин с точностью не хуже $\pm 1\%$.

В-третьих, устройства автоматической подготовки и ввода пробы (автосамплеры) и автоматические инжекторы обеспечивают разбавление с высокой точностью проб непосредственно перед вводом, нагревание и охлаждение

проб, допускают промывку или очистку иглы между введением проб. Объёмы проб могут изменяться от долей микролитра до миллилитров с точностью не хуже $\pm 0,2\%$. Нередки устройства для пробоподготовки, рассчитанные на одновременную обработку до 100 проб, при этом их программирование не представляет сложностей.

Помогает и то, что программы управления хроматографическими системами отличает изобилие функций, в частности, ведение журнала технического обслуживания, оценка пригодности системы для выполнения анализов, обеспечение выполнения надлежащей практики проведения работ в лаборатории (GLP). Все действия, выполняемые на хроматографе, и полученные в процессе работы результаты заносятся в архив. Во многих программах имеется функция предупреждения оператора по истечении определённого времени эксплуатации о необходимости замены отдельных элементов или планового профилактического обслуживания.

В-четвёртых, постоянно возрастают количество, качество и доступность растворителей высокой чистоты для ВЭЖХ. Это крайне важно, поскольку современные детекторы предполагают использование растворителей, не дающих ни одного хроматографического пика в холостом опыте в градиентном режиме даже на самой высокой чувствительности детектора. Снижение пределов обнаружения, отличающее современные детекторы, требует, чтобы качество растворителя не менялось от партии к партии, поскольку в противном случае не удастся обеспечить постоянство нулевой линии и отклика анализируемых веществ. В свою очередь, наличие более широкого спектра растворителей высокой чистоты с постоянными характеристиками способствует снижению пределов обнаружения, повышению чувствительности, улучшению воспроизводимости; более широкий выбор элюентов позволяет также улучшить селективность разделения.

В-пятых, количество типов и размеров колонок с высокими хроматографическими характеристиками практически бесконечно. По сути, разработки здесь достигли такой степени специализации, при которой зачастую колонки создаются для разделения одного набора анализируемых веществ. Если, в своё время, колонки обычно обозначались просто «C₁₈ (октадецилсиликагель)», «C₈ (октилсиликагель)», «цианопропил» и т. д., то сейчас, например, одного только октадецилсиликагеля, т.е. C₁₈, уже есть, по меньшей мере, семь принципиально разных видов фаз: с полимерной плёнкой, с мономерной плёнкой, с мономерной плёнкой с традиционным или нового типа блокированием остаточных групп (энд-кэппингом), с высоким и низким содержанием углерода, с дезактивированным носителем, а также на основе силикагеля сверхвысокой чистоты. Если при этом учесть, что средний диаметр зерна фаз может находиться в диапазоне 1,5 до 10 мкм, а его форма может быть как сферической, так и

неправильной, при этом диаметр пор может варьировать от 30 до 3000 ангстрем, материал может быть объёмно-пористым, поверхностно-пористым либо непористым, то число возможных вариантов характеристик заполнения колонок возрастёт экспоненциально.

Химическая обработка поверхности силикагеля позволяет получить как колонки общего применения (C_{18} , C_8 , цианопропил и пр.), предназначенные для разделения широкого спектра веществ, так и носители специального назначения (циклодекстрин, хиральный типа Пиркле, с пропиткой нитратом серебра и пр.), рассчитанные на разделение определённого типа соединений. Последнее слово в специализации – фазы с отпечатками молекул, предназначенные каждая для анализа одного конкретного вещества. Наконец, если ранее в качестве носителей использовали только силикагель и окись алюминия, сейчас применяют довольно необычные вещества, как то, окись циркония, графитированный углерод, гидроксилатит, а также множество органических полимеров и сополимеров.

В-шестых, и это, возможно, самое важное, ЖХ уже представляет собой хорошо оформленный метод, что проявляется в наличии многих тысяч готовых хорошо документированных методик. Заложенная в них информация даёт хроматографисту хороший исходный набор параметров для разработки новых методик, а во многих случаях и позволяет сразу же воспроизвести условия, при которых достигаются наилучшее разделение и количественное определение анализируемых веществ. Организации, распространяющие валидированные методики, (например, Фармакопейный комитет США (USP) [1] или Общество по испытаниям и материалам США (ASTM) [2]), а также организации [3], отвечающие за согласование межлабораторных программ валидации, например, Организация официальных химиков-аналитиков США (AOAC) [4], сыграли решающую роль в расширении возможностей самого метода ВЭЖХ и его применимости для широкого круга задач анализа. Процесс получения таких методик значительно ускорился с появлением средств оперативного компьютерного поиска и расширения публикации соответствующих журналов в электронной форме.

Изменение потребностей химической промышленности способствовало тому, что метод ВЭЖХ стал применяться в анализе гораздо большего круга веществ, даже тех которые ранее анализировали с помощью газовой хроматографии (ГХ). Критическим моментом, который определил эту тенденцию стал вопрос совместимости анализируемых веществ в пробе и особенностей самого метода анализа. Повышенные температуры, которые необходимы в инжекторе газового хроматографа, чтобы испарить анализируемые вещества с большой молекулярной массой, могут привести к разложению этих веществ или изменению их структуры. Хотя в некоторых случаях удаётся преодолеть этот недоста-

ток за счёт получения производных, каждая дополнительная стадия анализа влечёт за собой его удорожание и снижение производительности лаборатории. Разумеется, ВЭЖХ присущи свои ограничения, налагаемые, в частности, растворимостью пробы в растворителе и совместимостью пробы с растворителем, однако в целом эти ограничения куда меньше сдерживают применение метода, чем в случае ГХ. Зачастую пробу можно растворить и ввести в хроматограф непосредственно, избегая, таким образом, длительного процесса экстрагирования и концентрирования, либо получения производных. Для других случаев разработано множество растворителей и методик пробоподготовки.

ВЭЖХ, по всей видимости, будет всё шире использоваться в аналитических лабораториях в ближайшие десять лет. Этот метод можно считать вполне оформленным, иначе говоря, то, что беспокоило аналитиков раньше, забыто, теперь они сосредотачивают внимание на более сложных случаях разделения. При этом под «более сложными» следует понимать случаи, в которых не только большее количество пиков подлежат количественной обработке, но этому сопутствуют требования снижения предела обнаружения, приборных шумов, повышения чувствительности, улучшения селективности методики или её специфичности.

Эта книга, по идее, должна выступить как набор готовых рецептов для тех, кто вовсе не знаком с ВЭЖХ или обладает ограниченной подготовкой по этому методу. Для них здесь найдутся основополагающие сведения об эксплуатации и техническом обслуживании аппаратуры для ВЭЖХ и о том, как лучше всего избегать ошибок и устранять нештатные ситуации. Заметим, что для этого нужно знать, из чего состоит хроматографическая система, владеть терминологией хроматографии и быть осведомленными в её основных принципах. Подробности разработки методик, оптимизации разделения, фундаментальная теория хроматографии остались за рамками этой книги. Если они здесь и упоминаются, то вскользь. Зато в конце введения дан перечень превосходной литературы по теории разных вариантов разделения, разработке и оптимизации методик.

Чтобы хроматографисту было легче с помощью книги достичь того, ради чего она написана, то есть избежать ошибок в работе, книга разделена на три части и снабжена терминологическим указателем и приложением. В первых двух главах излагается строение аппаратуры для ВЭЖХ, вводится основная терминология по хроматографии, даются определения параметров и переменных, рассматриваются важные аспекты валидации методик и приборов.

Глава 1 посвящена аппаратуре для ВЭЖХ и является ознакомительной. Подробно описаны компоненты, широко используемые в ЖХ, дан обзор их

основных функций и важнейших характеристик. Описаны также взаимодействие компонентов установки друг с другом и порядок их соединения.

Глава 2 посвящена принципам, лежащим в основе разделения, в ней даны определения важнейших переменных и параметров. В этой главе читатель знакомится с терминами, часто встречающимися в литературе по ВЭЖХ и описаниях методик. В частности, вводятся понятия валидации работы аппаратуры для ВЭЖХ, валидации методики в общем виде и текущего контроля применимости конкретной аппаратуры.

Валидация самого хроматографа означает подтверждение того, что все его блоки функционируют в допустимых и предписанных пределах. Зачастую эти пределы определяются заданными изготовителем техническими характеристиками, например, диапазоном скоростей потоков, зависящим от рабочих параметров насоса, диапазоном объёмов пробы, зависящим от параметров инжектора, юстировкой, калибровкой по длине волны и яркостью лампы детектора. Кроме того, в главе 2 кратко описаны разные варианты классификации способов разделения в ЖХ.

Валидация аппаратуры для ВЭЖХ – процесс длительный и взыскательный. Его результатом является документальное свидетельство того, что прибор работает надлежащим образом. Такое свидетельство крайне важно для лабораторий, отвечающих за представление результатов в государственные органы, как то, Управление по пищевым продуктам и лекарственным препаратам США (FDA), Министерство сельского хозяйства США (USDA) и Управление по охране окружающей среды США (EPA). Полномасштабная валидация хроматографической аппаратуры сопряжена с большими временными и денежными затратами. Как правило, валидацию такого рода проводят не сотрудники лаборатории, а специальные уполномоченные фирмы.

Привлечение таких сторонних организаций к валидации на договорной основе обусловлено рядом соображений. Во-первых, их сотрудники специально обучены испытывать, обслуживать и ремонтировать приборы, на которые распространяются договоры. Во-вторых, зачастую эти же организации один-два раза в год осуществляют обслуживание в рамках плана профилактических регламентных работ. Во многих случаях договором также предусматривается, что в случае выхода оборудования из строя в течение одних-двух суток будут выполнены ремонт, а при необходимости, и повторная валидация. Ещё одно преимущество таких договоров состоит в том, что лаборатории не приходится держать на складе запасные части, которые стоят дорого, а понадобится могут редко. Наконец, сотрудники лаборатории могут не учиться специально ремонту оборудования, а сосредоточиться на получении и истолковании результатов.

Привлечение на договорной основе сторонних организаций целесообразно также, когда речь заходит о аудите (ревизии деятельности) действующей лаборатории, поскольку это – своего рода поручительство за надёжность ее работы. Уполномоченные организации оформляют все документы, связанные с подтверждением во время ревизии правильности работы оборудования. По сути, эти документы, удостоверяющие, что фактические показатели лабораторной системы соответствуют её эксплуатационным характеристикам, являются важнейшим подтверждением достоверности всех результатов, полученных с помощью этого прибора.

К сожалению, испытания и валидация жидкостного хроматографа на предмет соответствия заданным характеристикам – только первый из множества этапов, которые нужно выполнить, чтобы получать статистически достоверные и документированные результаты. После валидации прибора надлежит ещё разработать порядок выполнения анализов и провести его валидацию.

Как уже было сказано, подробное рассмотрение разработки методик выходит далеко за рамки этой книги. Достаточно отметить, что разработка методики – это общий процесс, однако каждый набор конечных результатов относится к *одному конкретному разделению и анализу*. Разработка методики представляет собой процесс, в котором заранее заданный набор анализируемых веществ разделяется и отделяется от побочных веществ матрицы. Затем осуществляют количественное определение анализируемых веществ. В процессе разработки методики определяют рабочие параметры, при которых осуществлены разделение и количественное определение. К ним относятся, например, колонка, состав подвижной фазы, скорость потока, порядок пробоподготовки и объём пробы, уровни квалификации стандартов, температура, вид детектора (и его установки), программа сбора данных и соответствующие параметры.

После того, как методика разработана и найдена приемлемой, она подлежит валидации (необходимым условием валидации методики является то, что система для ВЭЖХ работает в допустимых пределах, причём рабочие параметры для данного разделения соответствуют требуемым, то есть функционирование хроматографа также прошло валидацию). При валидации методики определяют её правильность и точность, рабочие пределы, воспроизводимость, пределы обнаружения, устойчивость к изменению внешних условий и параметры прибора, определяющие его пригодность для выполнения данной методики.

Оценка пригодности системы предполагает постоянный текущий контроль рабочих параметров, показывающих, как работает данная конкретная аппаратура для ВЭЖХ. Накопление данных с использованием валидированной

методики помогает гарантировать правильность получаемых результатов. А то, что в конкретном опыте все параметры системы находятся в пределах пригодности, в свою очередь, помогает гарантировать правильность и точность результатов, полученных для данного набора проб.

Из этого следует, что химику-аналитику важно знать сроки проведения, параметры и переменные, связанные с валидацией (оценкой пригодности) системы, поскольку любые отклонения в них могут указывать на возникновение нештатной ситуации или ошибки. Связь между этими параметрами и возможными ошибками рассматривается в главе 2.

Хотя валидация и постоянный текущий контроль аппаратуры в процессе анализа посредством оценки соответствия рабочих параметров пределам пригодности и дают возможность получать статистически достоверные результаты анализов, с течением времени неизбежно возникают отклонения в работе аппаратуры для ВЭЖХ от нормального режима. Действительно, одни детали и узлы (плунжеры, поршневые кольца) изнашиваются, другие (фильтры на входе и выходе, фритты, обратные клапаны) загрязняются, а некоторые (источник излучения детектора, колонка) – вырабатывают ресурс. Если отклонение по любой причине возникает в ходе анализа, его результаты могут оказаться полностью или частично недостоверными. Это влечёт за собой простой аппаратуры, необходимость повторного отбора и анализа проб, а зачастую – срыв сроков ввода в эксплуатацию производства или выпуска продукции.

Чтобы избежать этого, следует принимать предупредительные меры. Например, предположим, что срок службы уплотнений плунжеров – девять месяцев. Тогда их замена в порядке профилактики каждые шесть месяцев позволит практически исключить аварийный отказ. Действия такого рода получили название *регламентных профилактических работ* (понятие регламентных профилактических работ и соображения по поводу разработки их графика приведены в главе 3).

Чтобы как следует воспользоваться материалом главы 3, необходимо предварительно тщательно изучить главы 1 и 2. Дело в том, что в ряде случаев в главе 3 даются рекомендации по устранению нештатных ситуаций, проявляющихся в отклонении хроматографических параметров от допустимых, как это описано в главе 2. Соответственно, в главе 3 сложности, с которыми может встретиться в работе хроматографист, описаны не совсем обычным способом: основное внимание уделяется компонентам аппаратуры и типичным ошибкам, обусловленным неудовлетворительной работой, выходом из строя либо ненадлежащим использованием этих элементов. Для этого рассматриваются все компоненты аппаратуры для ВЭЖХ и роль каждого из них в функционировании её в целом. Затем указываются распространённые причины возник-

новения неисправностей и подробно излагаются подходы к их вычленению и устранению (протоколы устранения неисправностей).

В терминологическом указателе даны термины ВЭЖХ, в том числе, составные термины и сокращения, и их определения. Назначение указателя – послужить справочным пособием для тех, кто никогда раньше не работал с ВЭЖХ или работал достаточно давно (с возвращением!). В приложении приведены таблицы, графики и диаграммы, иллюстрирующие часто встречающиеся физические и химические параметры хроматографических систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фармакопейный комитет США (USP). Рокфорд, штат Мэриленд.
2. Общество по испытаниям и материалам США (ASTM). Уэст-Коншохокен, штат Филадельфия.
3. Ассоциация по косметике, гигиеническим принадлежностям и ароматическим веществам. Вашингтон, округ Колумбия.
4. Организация официальных химиков-аналитиков США. Гейтерсберг, штат Мэриленд.
5. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, and J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, 1997 (Снайдер Д., Керкланд Дж., Глайх Й. Разработка методик ВЭЖХ для практиков).
6. P.R. Brown and R.A. Hartwick (eds.), *High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, 1989 (Высокоэффективная жидкостная хроматография. Ред. П. Браун, Р. Хартвик).
7. L.R.Snyder and J.J.Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, 1979 (Снайдер Д., Керкланд Дж. Введение в современную жидкостную хроматографию).
8. B.A. Bidlingmeyer, *Practical HPLC Methodology and Applications*, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, 1992 (Бидлингмейер Б. Методика и приложения ВЭЖХ для практиков).
9. V.R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, 1994 (Мейер В. Высокоэффективная жидкостная хроматография для практиков).
10. U.D. Neue, *HPLC Columns: Theory, Technology and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997 (Нойе У. Колонки для ВЭЖХ: теория, технология и практика).
11. R.P.W. Scott, *Liquid Chromatography for the Analyst*, Marcel Dekker, New York, 1994 (Скотт Р. Жидкостная хроматография для аналитиков).

КОМПОНЕНТЫ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ВЭЖХ

На рис. 1.1 приведена для справок блок-схема аппаратуры для ВЭЖХ. Следует отметить, что в ней присутствуют дополнительные компоненты, которых нет, поскольку они не нужны, в большинстве обычных установок для ЖХ. Например, регуляторы давления, предколонки, блок постколоночной дериватизации (получения производных после разделения компонентов) имеют довольно ограниченное специализированное применение, однако источником ошибок они могут стать точно так же, как любой другой компонент хроматографической системы. Соответственно, они представлены для полноты картины и для понимания того, что может помочь устранить (или предотвратить) ошибки. Книга об ошибках в хроматографии была бы неполной и без рассмотрения пробоподготовки, хотя соответствующие устройства и не входят в прямом смысле слова в состав хроматографической аппаратуры.

1.1. Аппаратура для ВЭЖХ

Рассматривать компоненты аппаратуры для ВЭЖХ можно по-разному. Мы представим обзор блоков хроматографа в общем виде – от начала (т.е. блока подачи элюентов), затем через описание насоса, инжектора, колонки, детектора, и до конца (т.е. ёмкости для отработанных материалов).

Элюенты представляют собой чистые жидкости, смеси жидкостей или жидкости, в которых растворены модификаторы. Для обеспечения воспроизводимости при работе состав элюента должен быть описан полно и недвусмысленно, чтобы можно было приготавливать один и тот же элюент снова и снова. Приготовленные элюенты хранят в *резервуарах*, откуда они поступают в *насосы* за счёт действия плунжера и обратного клапана. Элюент поступает из резервуара, проходит через *входной фильтр* и *соединительный трубопровод*, как показано на рис. 1.2. Скорость, с которой жидкость прокачивается через фильтр и трубопровод, определяется вытеснительным объёмом и частотой циклов хода плунжера. Поскольку объём, вытесненный за один ход плунжера, для данного насоса есть величина постоянная, расход элюента регулируют, меняя частоту циклов хода плунжера.

КОМПОНЕНТЫ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ВЭЖХ

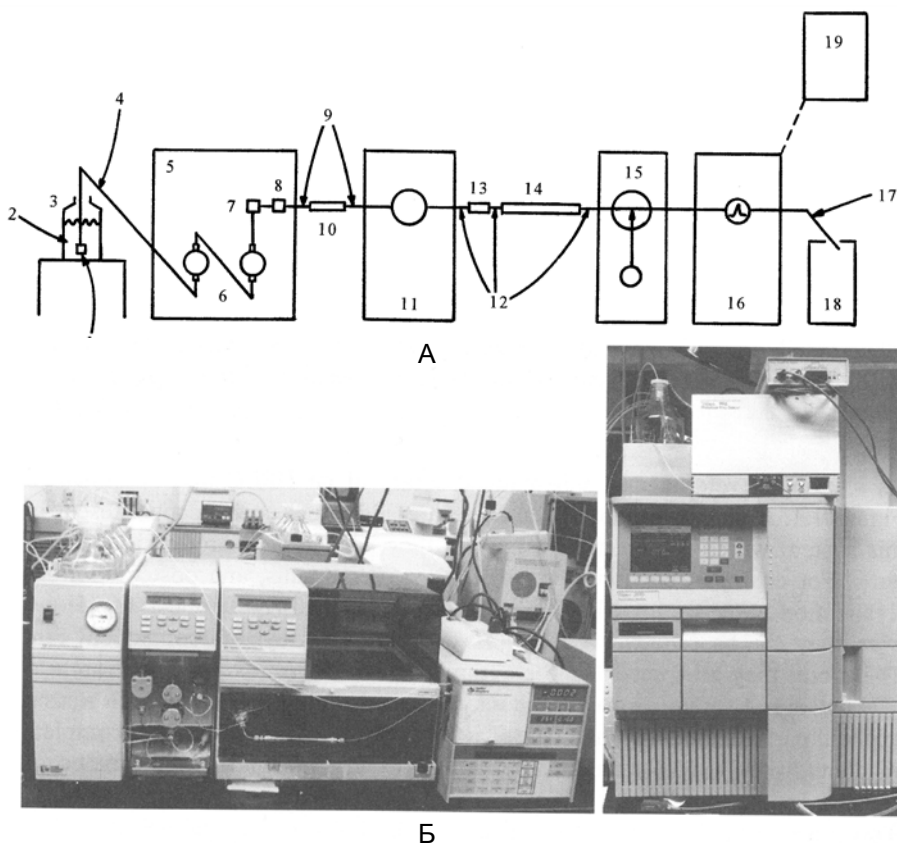


Рис. 1.1. (А) Структурная схема хроматографа для ВЭЖХ: (1) входной фильтр; (2) растворитель; (3) резервуар; (4) трубопровод низкого давления с большим внутренним диаметром; (5) насос; (6) корпус насоса в сборе; (7) датчик давления; (8) регулятор давления или фильтр в канале трубопровода; (9) трубопровод высокого давления с большим внутренним диаметром; (10) насыщающая предколонка; (11) инжектор (может быть автоматический) или автоматическое устройство подготовки и ввода пробы; (12) трубопровод высокого давления; (13) защитная предколонка; (14) аналитическая колонка; (15) послеколоночный реактор или блок пост-колоночной дериватизации; (16) детектор; (17) трубопровод низкого давления с большим внутренним диаметром; (18) резервуар для отработанного растворителя; (19) устройство сбора и обработки данных. (Б) Расположение компонентов аппаратуры для ВЭЖХ в лаборатории. Слева: традиционное расположение по горизонтали, каждый компонент занимает определённую площадь на рабочем столе. На фотографии слева направо: аппарат для дегазации, насос, инжектор и колонка, детектор (показана организация установки для изократического разделения, поскольку вытекающий поток рециркулируется в резервуар для растворителя). Справа: современное модульное исполнение, допускающее установку ряда компонентов аппаратуры друг на друга для экономии площади. Здесь: насос внизу, инжектор слева посередине, справа от него колонка, детектор и резервуар сверху. Также необходимо устройство сбора и обработки данных, которое занимает дополнительную площадь.

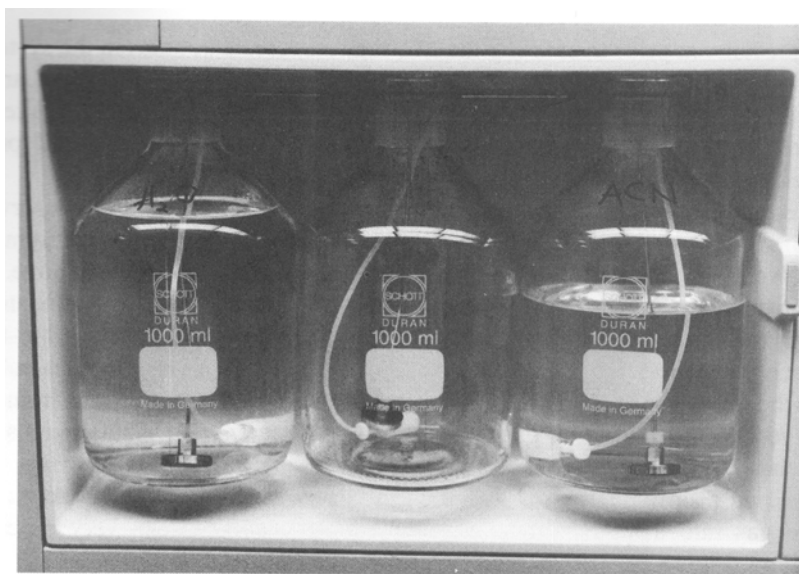


Рис. 1.2. Резервуары с трубкой для барботирования из спечённого стекла (белая) и входным фильтром и трубкой из нержавеющей стали (серые).

Входной фильтр зачастую изготавливают из нержавеющей стали, реже из фторопласта (политетрафторэтилен, иначе тефлон®) или спечённого стекла. Как правило, пористость входного фильтра довольно высока, так что он почти не препятствует прохождению элюента. Однако при слишком большом размере пор микрочастицы проникают сквозь фильтр в колонку. Входные фильтры подвержены накоплению остатка и могут постепенно засоряться некоторыми веществами, так что их необходимо время от времени чистить.

Соединительные трубопроводы зачастую изготавливают из фторопласта. Во многих случаях входной обратный клапан обработан под фторопластовую фланцевую муфту. Использование фторопластовых трубопроводов предоставляет ряд преимуществ. Во-первых, фторопласт не вступает в реакцию с наиболее распространёнными растворителями для ВЭЖХ. Далее, фторопласт гибок, дешёв, трубки из него выпускаются с самыми разными внутренними диаметрами и толщиной стенок, его легко резать и просто использовать. Наконец, фторопласт прозрачен, что позволяет оператору видеть, нет ли в трубопроводах пузырьков воздуха.

Как уже говорилось, перечисленные компоненты не должны препятствовать потоку элюента, поэтому используют входной фильтр с высокой пористостью и фторопластовые трубки большого внутреннего диаметра. Входной фильтр следует регулярно чистить или заменять на новый. Фторопластовые трубки также надлежит время от времени менять, но зачастую они могут прослужить больше года.

Хроматографисту, работающему с элюентами, нужно помнить, что растворённые в них газы могут вызвать нарушения в работе системы. Если не удалить газы из элюента до попадания в хроматограф, они могут выделяться в виде пузырьков, которые, накапливаясь в детекторе, вызывают усиленный дрейф нулевой линии. Более крупные пузырьки могут скапливаться в обратных клапанах, из-за чего может меняться произвольным образом расход и нарушаться градиентный режим. Чтобы этого избежать, элюент перед использованием *дегазируют*.

Дегазировать элюент можно четырьмя основными способами. Первый состоит в том, чтобы поместить резервуар с элюентом в ультразвуковую баню. Второй – в вакуумировании элюента (превосходный результат даёт сочетание вакуумирования и ультразвуковой обработки). Третий подход заключается в установке блока дегазации на пути тока элюента. Этот блок может быть малогабаритным, и тогда он крепится на резервуаре, либо отдельно стоящим, соединённым трубопроводами с резервуаром и корпусом насоса. В обоих случаях при поступлении жидкости из резервуара его пропускают через пористый фильтр с вакуумом, удаляя таким образом растворённые газы. Четвёртый вариант состоит в том, что фильтр из спечённого стекла или нержавеющей стали устанавливают внутри резервуара. Этот фильтр присоединён к источнику газа для барботирования, так что этот газ постоянно прогоняется через фильтр с незначительным расходом. Фильтр разбивает газ на множество мельчайших пузырьков, так что обеспечивается весьма эффективная дегазация. Примеры аппаратов для дегазации показаны на рис. 1.3.

После того, как элюент попал в насосную систему, его называют *подвижной фазой*. Заметим, что на практике в ВЭЖХ подвижная фаза – это и есть элюент (чистый растворитель или модифицированный), так что два эти термина взаимозаменяемы. Более корректно использовать термин «подвижная фаза» там, где речь идёт о фазах в колонке, поскольку там подвижная фаза прокачивается сквозь неподвижную фазу (иначе набивку).

А



Б

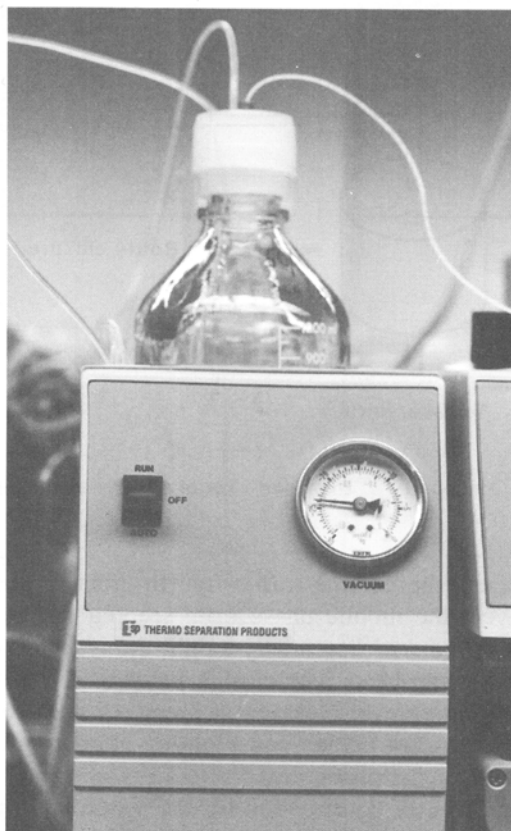


Рис. 1.3. Различные приборы для дегазации: (А) фильтр с вытяжкой; вакуумирование производится через боковой патрубок, входной и выходной фторопластовые трубопроводы размещены посередине; (Б) механическое устройство с вакуумированием до заданной степени разрежения (на передней панели имеется вакуумметр). Продолжение на следующей странице.

Состав подвижной фазы во времени может оставаться постоянным (*изократическое элюирование*) или изменяться (*градиентное элюирование*). От подвижной фазы зависит общее *среднее* время удерживания анализируемых веществ: при *более сильном элюенте* времени элюирования будет меньше, при *более слабом* – больше. Градиентные режимы элюирования могут быть самыми различными: линейный, экспоненциальный, ступенчатый и т.д. Некоторые, наиболее распространённые, из них показаны на рис. 1.4.

Столь различные графики градиентного режима используются для того, чтобы как можно лучше разделить (разрешить) пики анализируемых веществ и при этом как можно более сократить продолжительность анализа. Независимо от того, какой именно режим используется, зачастую забывают, хотя это очень важно, что состав подвижной фазы в конце режима отличается от того, что был в начале. Соответственно, прежде, чем вводить новую пробу, систему нужно вернуть в исходное состояние. Часто на то, чтобы полностью уравновесить систему в исходном состоянии, требуется довольно много времени. Для этого нужно, прежде всего, промыть *свободный объём трубопровода*, то есть объём между корпусом насоса и инжектором (называемый также «*мертвым*» *объёмом*), сам инжектор, все соединительные трубопроводы, детектор, объём пустого пространства, не заполненного сорбентом, в колонке («*холостой объём*» колонки). К тому же, уравнивание элюента с колонкой не происходит мгновенно, для этого необходимо прокачать сквозь колонку от пяти до десяти её объёмов.

Как уже было сказано, подвижную фазу прокачивает через колонку насос. При этом образуется давление – за счёт *вязкости* самой подвижной фазы (вязкость – это свойство жидкости оказывать сопротивление перемещению) и сложной геометрии пути элюента в колонке (так называемая *трещиноватость слоя сорбента* в колонке). Чтобы обеспечить постоянство расхода и предотвратить протечку подвижной фазы между корпусом насоса и плунжером, используется *уплотнение плунжера* – уплотнительное кольцо, обычно на плотной посадке, зачастую подпружиненное. Плунжер и уплотнение должны прилегать друг к другу достаточно плотно, чтобы при давлениях до 40 МПа (6000 фс/дюйм^2) не возникало протечки. При этом уплотнение не должно вызывать затирания или выкрашивания поверхности плунжера, а плунжер – приводить к ускоренному истиранию поршневого кольца.

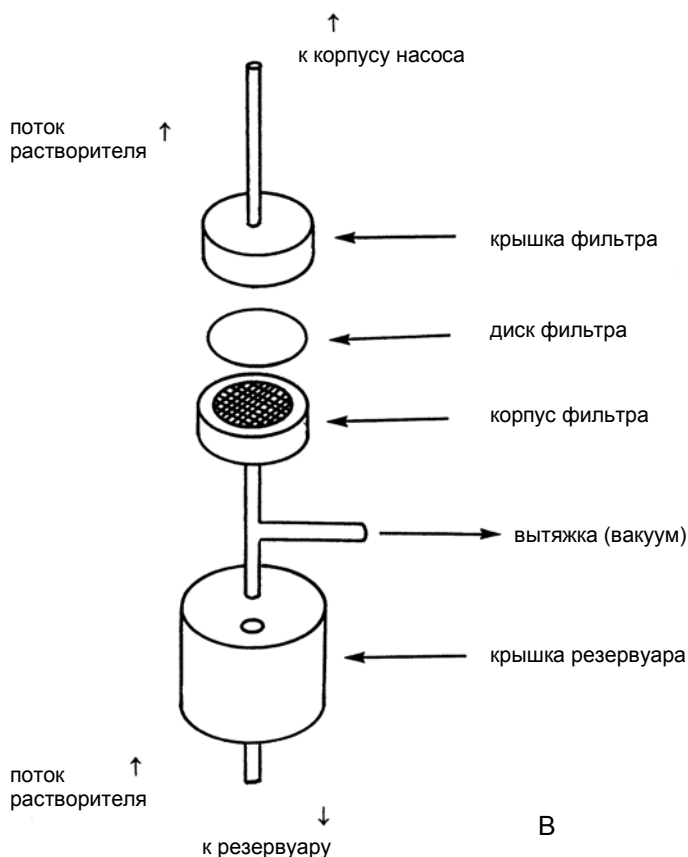


Рис. 1.3 (продолжение). (В) – детали прибора для дегазации на основе фильтра с вытяжкой.

Для изготовления плунжеров чаще всего используют сапфир. Параметры насоса зависят от диаметра, длины и шероховатости поверхности плунжера. Соответственно, механическую обработку плунжера выполняют с крайне малыми допусками. Зачастую его крепят в держателе из нержавеющей стали, который, в свою очередь, присоединяется к приводному механизму (например, эксцентриковому).

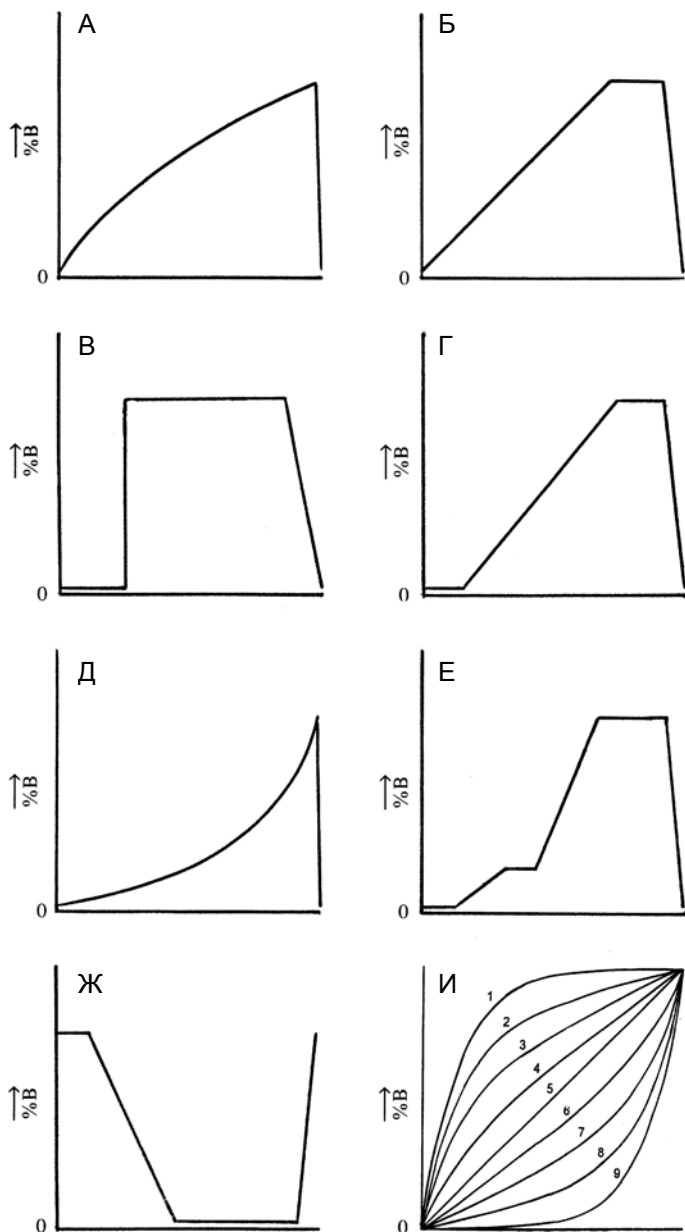
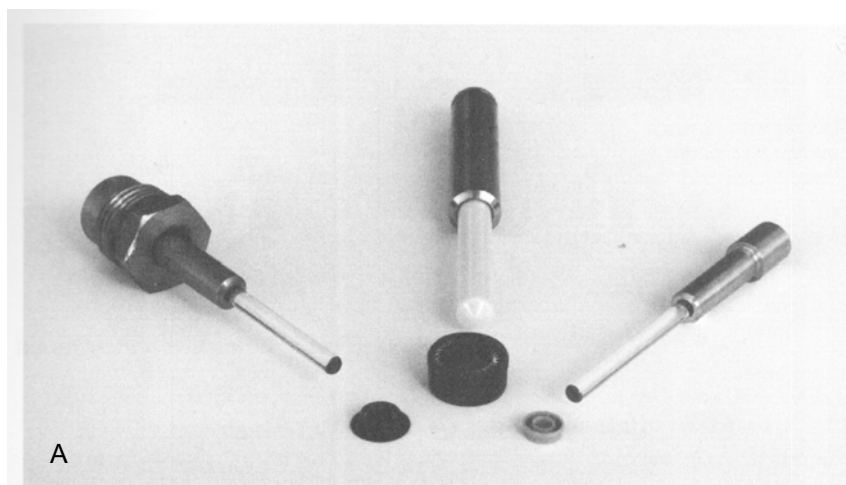


Рис. 1.4. Графики градиентного элюирования: (А) выпуклый; (Б) линейный; (В) ступенчатый; (Г) вначале постоянный, затем линейный; (Д) вогнутый; (Е) полилинейный; (Ж) обратно-линейный; (И) предварительно запрограммированные для хроматографов фирмы Уолтерс: вогнутые (кривые 6–9), линейный (кривая 5) и выпуклые (кривые 1–4)

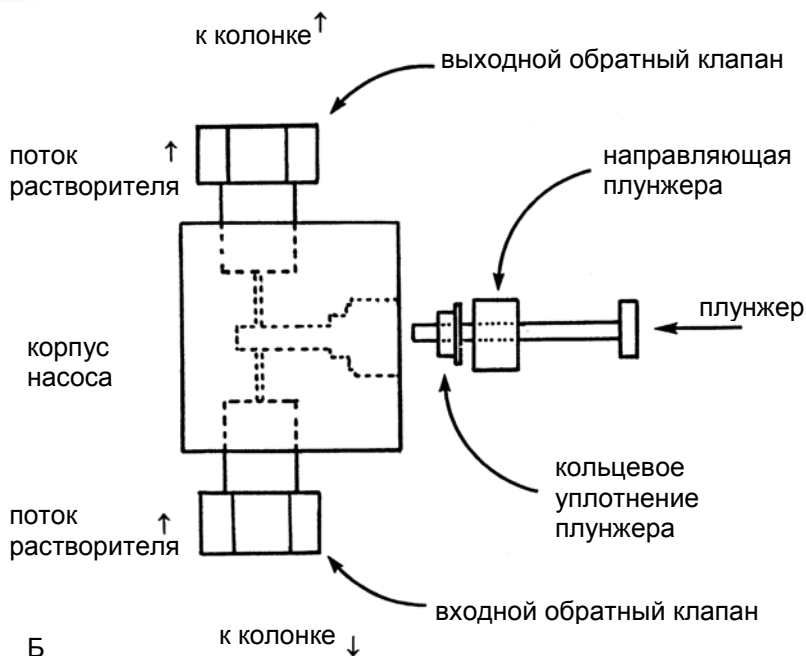
Уплотнение плунжера выполняют из мягкой пластмассы. Время от времени его нужно заменять, поскольку оно истирается под действием плунжера. Чтобы обеспечить требуемую плотность сочленения, не допустить протечки и ускоренного износа, следует использовать только те уплотнения плунжера, которые изготовлены специально для таких насосов. Напротив, плунжеры в замене не нуждаются, разве что при случайном задире, сколе или поломке. Их просто тщательно очищают при каждой замене уплотнения. На рис. 1.5 показаны варианты исполнения плунжерных узлов и соответствующие кольцевые уплотнения.

Насос включает один или несколько *узлов*, состоящих из *корпуса и плунжера*. Корпус насоса обычно выполнен из нержавеющей стали марки 316. В корпусе имеется небольшая полость. Перемещение плунжера в полость и из неё приводит, соответственно, к подаче в колонку и выкачиванию из резервуара очередной порции элюента. Полный цикл работы плунжера начинается с медленного управляемого выдвижения плунжера в полость до упора, при этом вся находившаяся в полости подвижная фаза подаётся в колонку. Затем следует быстрое выведение плунжера из полости (*обратный ход*), при котором новая порция элюента заполняет полость, после чего начинается следующий цикл. Диапазон скоростей подачи элюента насосом зависит от сочетания объёма полости, диаметра плунжера, длины хода плунжера и скорости его перемещения. Как правило, различают микронасосы (расход от 1 до 500 мкл/мин), аналитические (от 0,1 до 10 мл/мин) и препаративные насосы (расход свыше 5 мл/мин. Диапазоны расходов приведены примерные. Точные параметры насоса указывает в паспорте фирма-изготовитель).

Для изократического элюирования достаточно одного насосного узла корпуса с плунжером. Для градиентного режима требуются либо несколько насосных узлов, либо ряд соленоидов, управляющих расходом элюентов из нескольких резервуаров через один насосный узел. В любом из случаев градиентный режим предполагает смешение элюентов двух или более различных составов в изменяющейся пропорции. Смешивание может осуществляться либо до того, как элюент достигает плунжера (это называется *смешиванием под низким давлением*), либо после плунжера (*смешивание под высоким давлением*). Для смешивания под высоким давлением чрезвычайно важна дегазация, поскольку в результате подвижная фаза смешивается в малом объёме под большим давлением. Газовыделение при смешивании в этом случае вызовет серьёзные нарушения нормальной работы системы.



А



Б

Рис. 1.5 (А) Плунжерные узлы трёх насосов. Слева и справа – узлы для аналитических опытов, посередине – для полупрепаративных. Следует обратить внимание на различия в диаметре плунжеров и форме поршневых колец. В каждом плунжерном узле внутри пластмассового корпуса имеется спиральная пружина, обеспечивающая герметизацию сочленения вокруг плунжера под высоким давлением. (Б) Устройство насоса.

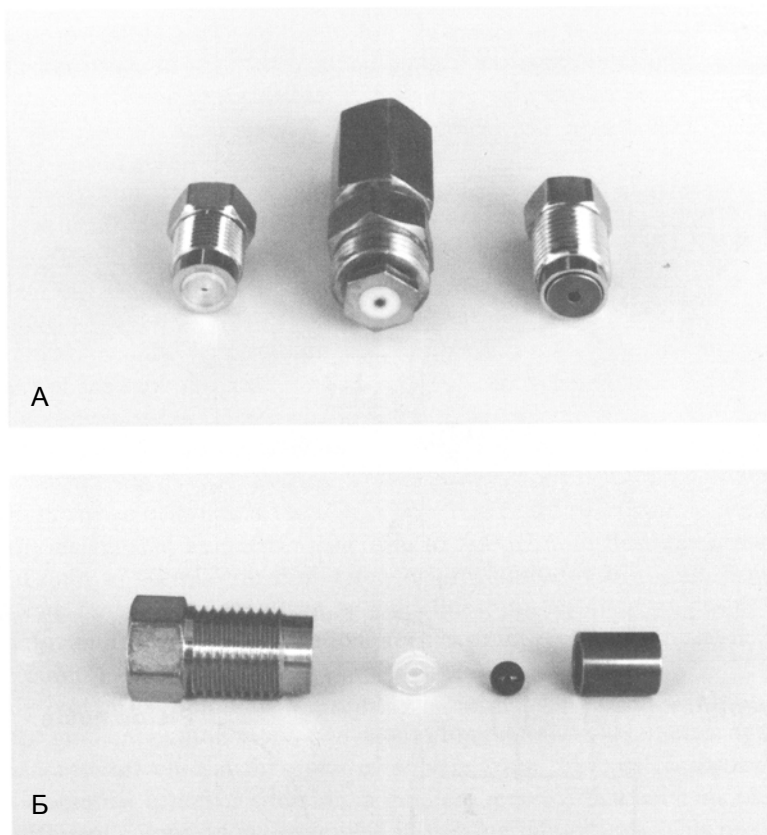


Рис. 1.6. (А) Три обратных клапана в сборе для трёх различных насосов. (Б) Обратный клапан в разобранном виде. Второе седло монтируется в правом полукорпусе (продолжение на следующей странице)

В насосных узлах, как правило, используются *обратные клапаны*, как показано на рис. 1.6. *Входной обратный клапан* препятствует противотоку подвижной фазы в резервуар для элюента. *Выходной обратный клапан* предотвращает всасывание подвижной фазы из колонки в насос. В момент, когда плунжер полностью введён (соответственно, подвижная фаза подана в колонку), поток в прямом направлении прекращается. Расход элюента остаётся почти нулевым во время возврата плунжера и всасывания новой порции элюента в полость насоса, пока плунжер не начнёт снова вводиться в корпус. На рис. 1.7 А показан график скорости потока в ряде циклов хода плунжера в одноплунжерном насосном узле.

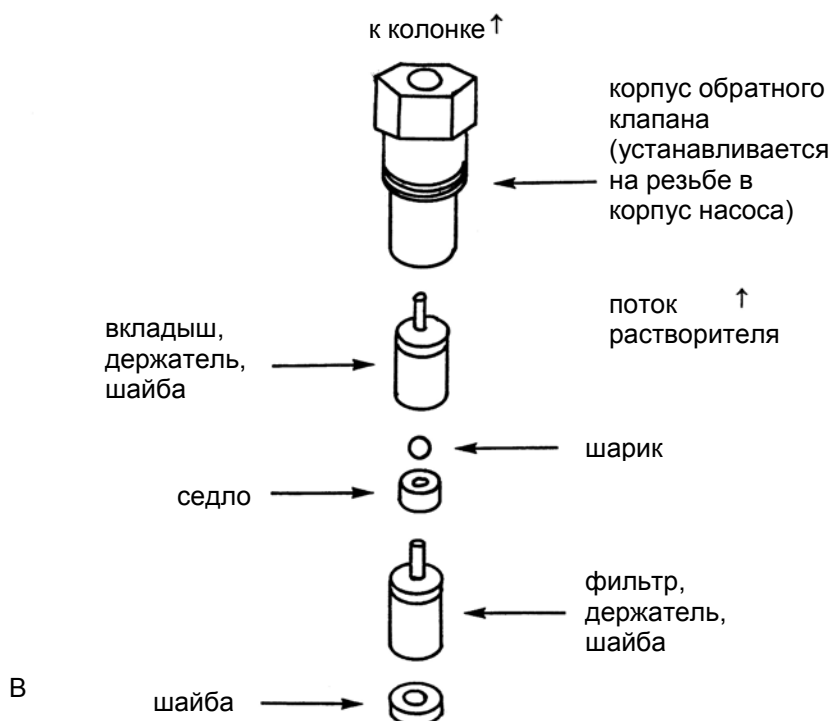


Рис. 1.6 (продолжение) (В). Конструкция выходного обратного клапана.

Чтобы сгладить влияние прерываний потока, в старых конструкциях одноплунжерных насосов использовали *демпферы пульсаций*, представлявшие собой трубки достаточно большого объёма между насосом и инжектором. Сам по себе объём такой трубки, а также небольшая, но ненулевая сжимаемость элюента обеспечивали постоянство скорости потока, пусть и несколько сниженной. К сожалению, такая конструкция оказалась неприемлемой для градиентного режима из-за непроизводительного в хроматографическом смысле холостого объёма.

Другой способ сглаживания графика скорости потока состоял в использовании компенсирующего *восстановительного плунжера*, с большой скоростью совершавшего возвратно-поступательное движение во время обратного хода основного плунжера. Это движение было рассчитано на то, чтобы создать кратковременный импульс давления, перекрывающий время обратного хода основного плунжера, и, таким образом, сгладить общие давление

и скорость потока. Такая конструкция насоса предшествовала двухплунжерной схеме.

Лучший способ избавиться от пульсаций потока – использовать двухплунжерную изократическую систему. Плунжеры находятся в двух отдельных корпусах, а их движение согласовано так, что пока один из них подаёт подвижную фазу в колонку, другой всасывает её в полость насоса из резервуара. Иначе говоря, перемещение плунжеров имеет сдвиг по фазе на 180° . Шум нулевой линии в этом случае минимален, но обслуживание такого насоса (с двумя плунжерами, двумя поршневыми кольцами и четырьмя обратными клапанами) становится более трудоёмким. График скорости потока представлен на рис. 1.7 (Б).

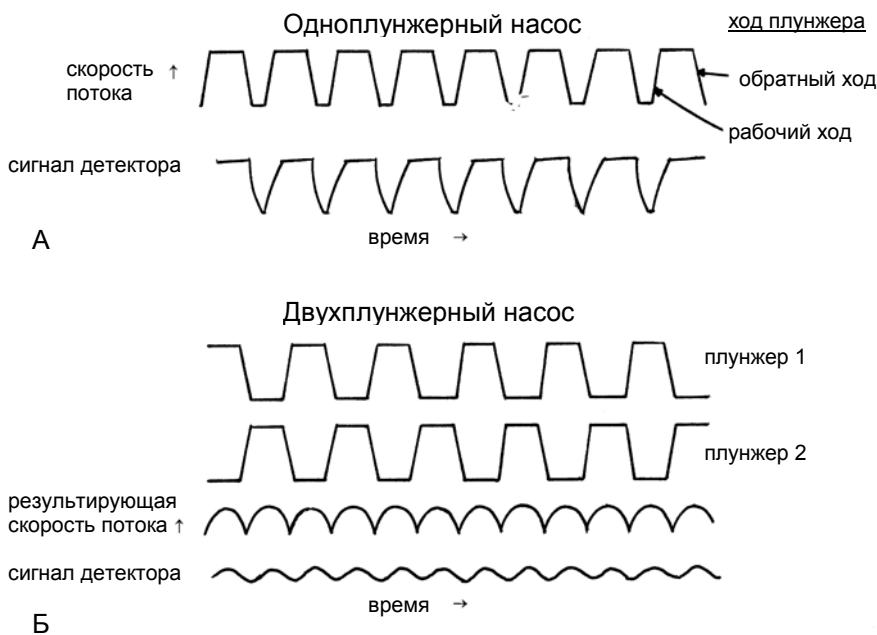


Рис. 1.7. Шум нулевой линии обусловленный работой насоса: (А) График скорости потока через одноплунжерный насос (вверху) и соответствующий сигнал детектора (внизу). (Б) Графики скорости потока для каждого из плунжеров двухплунжерного насоса (верхняя пара), результирующая скорость потока (посередине) и соответствующий сигнал детектора (внизу). Амплитуда отклика детектора зависит от того, насколько детектор чувствителен к колебаниям давления и расхода.

В современных установках для ВЭЖХ градиентный режим реализуется смешением под низким давлением в одноплунжерной системе или под высоким давлением в двухплунжерной системе. В системах смешения под низким давлением используются соленоиды, чтобы выдержать требуемое соотношение количеств элюентов из разных резервуаров. При смешении под высоким давлением используются два отдельных насосных узла с плунжерами и обратными клапанами. Самые современные насосные системы куда сложнее. По схеме они также являются двухплунжерными, однако в каждом плунжерном узле постоянно контролируется скорость потока, и любое её отклонение немедленно устраняется за счёт изменения скорости двигателя, приводящего в движение насос. В результате в современных насосах погрешность при поддержании постоянного расхода значительно менее 1 %, тогда как ещё десять лет назад она была около 2 %.

Обычно в насосном узле сверху и снизу корпуса имеются *входной* и *выходной обратные клапаны*. Их назначение в том, чтобы поток подвижной фазы протекал всегда только в одном направлении: от насоса – в колонку. Обратный клапан состоит из корпуса, двух сёдел и сапфирового шарика. Конструкция насосного узла с такими клапанами показана на рис. 1.8. Существуют также значительно более сложные конструкции, например, насосы моделей 1050 и 1100 фирмы Хьюлетт-Паккард. В этих насосах в выходной обратный клапан встроен фильтр, задерживающий частицы, образующиеся при разрушении поршневых колец или прошедшие сквозь входной фильтр и оставшиеся в растворе. Фильтры нуждаются в регулярной замене.

Поскольку между выходным обратным клапаном и колонкой может иметь место значительный перепад давления, все соединения должны представлять собой трубопроводы, способные выдержать высокое давление. Соединение между выходным обратным клапаном и инжектором обычно выполняют трубками среднего внутреннего диаметра (от 0,25 до 0,5 мм) из нержавеющей стали. Трубки большего диаметра не применяют, чтобы избежать излишнего холостого объёма, а меньшего – чтобы снизить вероятность засорения.

Во многих насосных системах между выходным обратным клапаном и инжектором помещают *датчик давления*. Этот компонент постоянно измеряет давление в системе. Величина давления выводится на манометр, аналоговый или цифровой. В каких единицах измерять давление, решает изготовитель. Чаще всего используются единицы «паскаль» (*Па*), «бар» (*бар*), «атмосфера» (*ат*) и «фунт-сила на квадратный дюйм» (*фс/дюйм²*). Важно использовать единицы, принятые в соответствующей стране. Коэффициенты пересчёта внесистемных единиц в единицы системы СИ таковы:

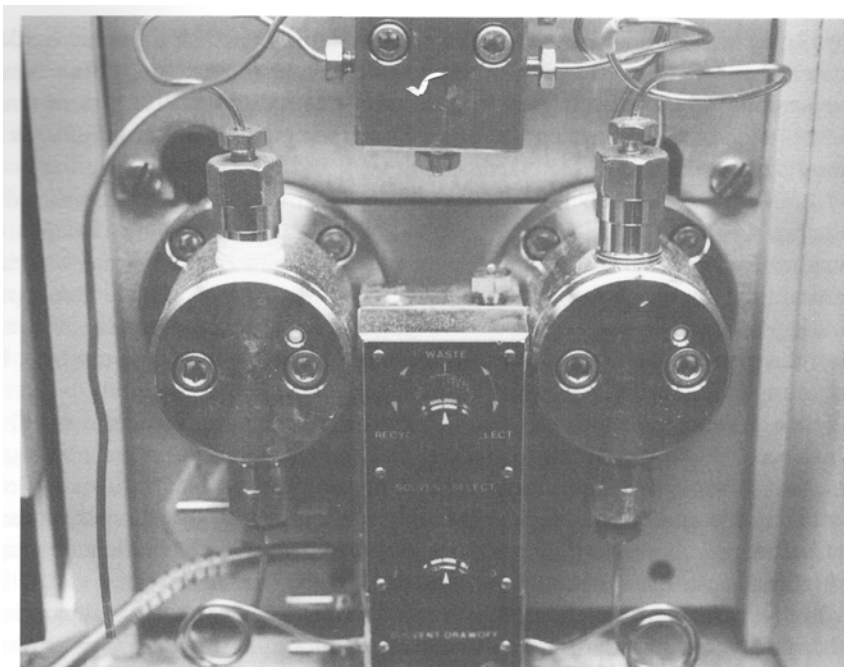


Рис. 1.8. Двухплунжерный насос. Белые кнопки в правой верхней части корпуса указывают положения плунжеров. Можно видеть, что положение обоих плунжеров в полостях корпусов почти совпадает. Однако при этом один из них подаёт в колонку, а второй – всасывает из резервуара.

$$1 \text{ ат} = 98\,066,5 \text{ Па}$$

$$1 \text{ бар} = 100\,000 \text{ Па}$$

$$1 \text{ фс/дюйм}^2 = 6\,894,76 \text{ Па}$$

Показывающий прибор, на который выводится измеряемый перепад давления в насосной системе, может быть проградуирован в любой из указанных единиц. Изготовители же колонок почти все предпочитают указывать перепад давления на колонке в барах или фунт-силах на квадратный дюйм.

В нормально работающей установке для ВЭЖХ наибольший перепад давления возникает на колонке. Следовательно, размещение датчика давления между насосом и инжектором позволяет измерять давление *на входе* в колонку (на фитинге, присоединённом к инжектору). Соединительные трубопроводы и детектор обычно мало сказываются на общем перепаде

давления в системе ($\ll 10\%$). В результате давление на выходе колонки зачастую близко к атмосферному, иначе говоря, давление на колонке падает почти полностью.

В результате любые заметные ($> 10\%$) изменения перепада давления в системе при неизменных условиях работы говорят о том, что в ней что-то существенно изменилось. Скорее всего, что-то произошло с колонкой. Небольшие изменения заметить труднее, и вызвавшие их изменения в системе могут также быть незначительными. Зачастую их невозможно отличить от обычных флуктуаций, обусловленных температурой и тому подобными факторами. Тем не менее, не стоит оставлять без внимания даже такие изменения, поскольку и они могут оказаться полезными для обнаружения нештатных ситуаций.

Безопасность работы системы обеспечивается предельным давлением, выше которого реле датчика давления отключает насос. Это препятствует затиранию плунжера, возникновению внутренних течей, разрыву муфтовых соединений. Важно также уделять особое внимание наибольшему допустимому давлению на колонке. Иными словами, максимальное рабочее давление, на которое программируют насос, должно быть существенно ниже наибольшего допустимого давления *системы в целом* (то есть, по сути, колонки). Во всех случаях следует обращаться к техническим характеристикам, указанным изготовителем.

Хотя детекторы по большей части мало влияют на общий перепад давления в системе, важно помнить, что и для них имеется *наибольшее допустимое* рабочее давление. Поэтому советуем выход детектора соединять с ёмкостью для отработанного элюента трубкой большого внутреннего диаметра. Если несколько детекторов включаются последовательно, следует обращать особое внимание на правильный порядок их следования (детектор, выдерживающий самый высокий перепад давления, нужно помещать перед остальными).

Колонка в сочетании с подвижной фазой выполняет разделение анализируемых веществ. Хотя колонка располагается в хроматографе дальше от насоса по схеме, сравнительно высокие расходы на её замену заставляют дополнять систему ВЭЖХ различного рода защитными компонентами. Повреждение колонки определяется любыми условиями, вызывающими такие необратимые изменения состояния поверхности колонки, при которых меняются форма, разрешение или время выхода пиков. Из числа компонентов аппаратуры для ВЭЖХ вызвать повреждение колонки могут элюент, насос и проба.

Совместимость элюентов с колонками является, скорее, правилом, чем исключением. Однако в некоторых случаях приходится использовать агрессивные элюенты (т.е., такие, которые могут быстро вызвать необратимое повреждение). В некоторых случаях серьёзные нарушения работы могут вызывать имеющиеся в элюенте примеси. Приведём некоторые примеры подобных сочетаний элюентов и колонок.

1. Буферы, кислотные или основные, из-за которых pH элюента > 8 или < 2 , при использовании с колонкой на силикагеле.
2. Элюенты с различным содержанием воды при использовании с колонкой на непривитом силикагеле или немодифицированной окиси алюминия.
3. Сополимеры полистирола и нестабилизированный тетрагидрофуран (ТГФ), содержащий пероксиды, которые вступают в химическую реакцию с полимером.

Чтобы защитить колонку от агрессивных элюентов, либо особым образом подготавливают растворители (например, сушат перед использованием на силикагеле или окиси алюминия, или стабилизируют, как в случае с ТГФ, перед использованием с сополимерами полистирола), либо используют *насыщающую колонку*. Эта колонка содержит материал, сходный с используемым в основной, аналитической колонке: если в аналитической колонке содержится октилсиликагель (C_8), то и в насыщающей колонке должен быть октилсиликагель. Главное отличие её от аналитической состоит в том, что в насыщающей колонке размер зерна больше и имеет более широкое распределение. К тому же, хотя площадь поверхности материала насыщающей колонки должна быть достаточно большой, чтобы обеспечить взаимодействие с подвижной фазой, распределение размера пор также может быть широким.

Выбор такого материала и собственно применение насыщающей колонки в системе основаны на том, что подвижная фаза растворяет набивку предколонки. Это – колонка, которой жертвуют, чтобы насытить подвижную фазу растворённым материалом набивки. В приведенном примере используют октилсиликагель, чтобы насыщенная им подвижная фаза не так быстро растворяла набивку дорогостоящей аналитической колонки. Чтобы насыщающая колонка работала эффективно, площадь поверхности её материала должна быть большой, т.е. этот материал должен обладать высокой пористостью. Большой размер зерна материала выбирается по следующим соображениям: во-первых, его стоимость в 10 – 20 раз меньше, чем материала аналитической колонки, во-вторых насыщающую колонку легко заполнить и заменить набивку сухим способом (вручную), в-третьих,

перепад давления при прохождении подвижной фазы через насыщающую колонку мал. Заметим, что требование к малому перепаду давления является довольно существенным обстоятельством, поскольку в некоторых случаях насыщающую колонку помещают до датчика давления и перепад давления на ней не контролируется. Независимо от сказанного, из этой колонки следует регулярно удалять набивку, чистить или заменять колонку и фитинги, после чего набивать насыщающую колонку свежим материалом.

Физическое повреждение аналитической колонки может иметь место, если структура материала набивки в колонке изменяется. Это может произойти при механическом ударе, например, вследствие падения колонки, или скачкообразном повышении или падении расхода. К физическому повреждению может также привести скапливание микрочастиц на входе в колонку. Такие микрочастицы чаще всего встречаются в элюентах, приготовленных с использованием буферных растворов и модификаторов подвижной части, приготовленных из твёрдых веществ (например, калий-фосфатные буферы или додецилнатриевые ион-парные реактивы). Такие элюенты весьма целесообразно профильтровать перед использованием. Микрочастицы также образуются при затирании плунжера насоса и истирании поршневого кольца. Подвижная фаза подхватывает их и уносит в колонку.

Для того чтобы исключить попадание в инжектор и колонку жидкостного хроматографа микрочастиц, образующихся в подвижной фазе или за счет разрушения уплотнения плунжера, используют *фильтр, устанавливаемый в капиллярном трубопроводе*. В таком фильтре, как правило, имеется небольшая сменная фритта (обычно из нержавеющей стали или полиэфирэфиркетона (ПЭЭК) с размером пор от 0,5 до 2,0 мкм). Фритту необходимо регулярно заменять. Пример конструкции такого фильтра показан на рис. 1.9. Материал фритты зачастую находится в пластмассовом кольце (фритта в оболочке), чтобы улучшить плотность сочленения фритты с корпусом фильтра под высоким давлением.

Датчик давления предназначен для измерения перепада давления в хроматографе. Непрерывный контроль давления – важный приём профилактики нарушений нормальной работы. Слишком высокое давление (на 20 % и более выше номинального) зачастую свидетельствует о наличии засорения. В более тяжёлых случаях датчик давления работает как защитное устройство: если достигается некий заданный максимально допустимый уровень перепада давления, запускается программа остановки системы (обратите внимание, что датчик давления не определяет причину повышения давления). Это предохраняет плунжер от затирания, а материал набивки – от раздавливания.

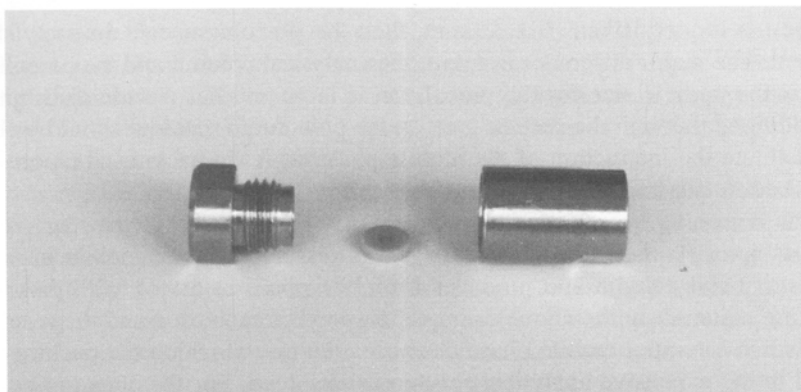


Рис. 1.9. Фильтр, устанавливаемый в потоке (увеличенное изображение): полумуфта с наружной резьбой (слева); фритта в оболочке (посередине), полумуфта с внутренней резьбой (справа).

Все рассмотренные до сих пор компоненты аппаратуры для ВЭЖХ были предназначены для приготовления и подачи в колонку элюента. Описаны также защитные устройства, помогающие предотвратить аварийный выход из строя насоса и колонки. Далее мы остановимся на том, как осуществляется ввод пробы в систему, разделение пробы на компоненты и детектирование.

Чтобы избежать терминологической путаницы, «матрица», содержащая вещества, подлежащие анализу, независимо от физического состояния (твёрдое, жидкое или газообразное) будет называться *пробой*. Проба содержит анализируемые вещества, называемые также *аналитами*. Кроме того, проба содержит неконтролируемые в процессе анализа вещества, которые в совокупности будут именоваться *примесями*. Проба представляет собой либо исходную матрицу, растворённую в жидкости, либо жидкость, содержащую аналиты после некоторой последовательности этапов пробоподготовки. Как только проба приобретает вид, пригодный для анализа, её вводят в подвижную фазу с помощью *устройства ввода пробы*, также называемого *инжектором*.

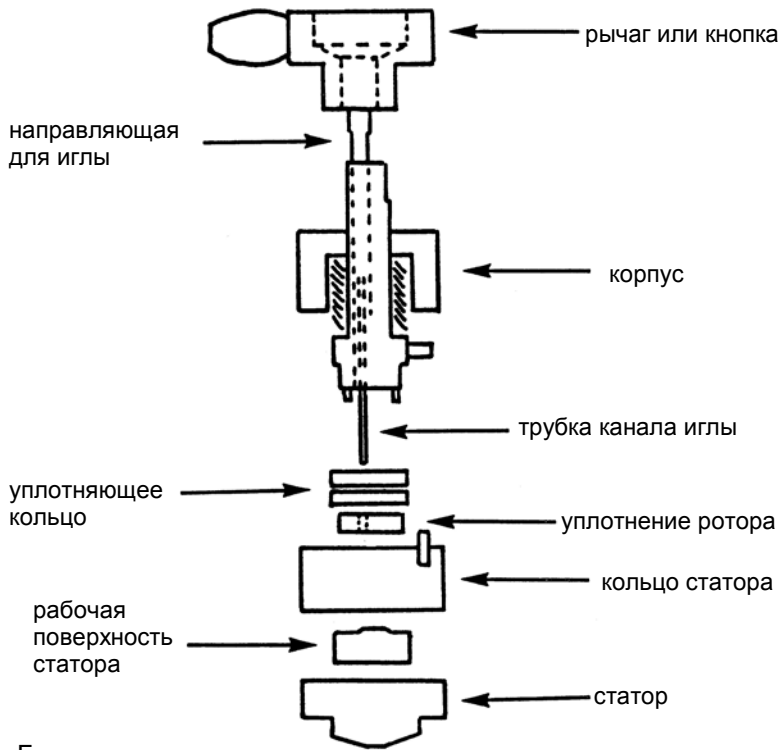
Инжектор с большой точностью отмеряет определённый объём пробы перед вводом в подвижную фазу. Ручной инжектор включает петлю-дозатор и приёмник для иглы шприца (рис. 1.10). Проба вводится в инжектор с помощью шприца-пробоотборника. У разных изготовителей инжекторов различаются внутренний диаметр иглы, её длина и форма шприца (рис. 1.11). Следовательно, правильно ввести пробу в инжектор можно только шприцем, предназначенным специально для этого инжектора.



Рис. 1.10. Ручной инжектор. (А) Канал инжектора находится по оси подпружиненного рычажка для ввода. Корпус и ротор находятся непосредственно за рычажком. Статор – наиболее удалённая деталь инжектора, к которой присоединена петля (продолжение на следующей странице).

Шприц-дозатор состоит из трёх частей: иглы, через которую отбирается и подаётся проба, прецизионного цилиндра (часто стеклянного), в котором проба содержится, и притёртого к цилиндру поршня, при перемещении которого проба всасывается в цилиндр или выталкивается из цилиндра. Как правило, поршни шприцев выполнены из нержавеющей стали или металла с фторопластовым наконечником. Выбор поршня определяется природой образца (например, работа с коррозионно-активным веществом предполагает выбор поршня с фторопластовым наконечником). Поршень притирают к цилиндру в процессе изготовления, чтобы при работе вещества пробы не просачивались мимо поршня в тыльную часть цилиндра. Дело в том, что такое просачивание приведёт к загрязнению последующей пробы веществом предыдущей. Заменять отдельно поршень или отдельно цилиндр не рекомендуется.

Игла шприца может быть съёмной или несъёмной. Шприц со съёмной иглой гораздо легче чистить, а если игла засорилась, её можно заменить на новую. Шприцы с несъёмной иглой дешевле, но чистить их труднее. А чистить шприц нужно регулярно, поскольку от этого зависит воспроизводимость результатов.



Б

Рис. 1.10. Ручной инжектор (продолжение). (Б). Детали конструкции ручного инжектора фирмы Реодайн.

Коммутация петли инжектора осуществляется так, что петля либо выводится из потока подвижной фазы, и при этом в неё вводится проба, либо вводится в поток, так что проба вымывается из петли подвижной фазой. Этот процесс называется *инжекцией* или *вводом пробы*. Далее проба подаётся из инжектора через соединительный трубопровод в колонку. Высокая точность достигается в случае переполнения (промывкой) петли. Если петля не заполняется, точность ввода пробы определяется точностью шприца и воспроизводимостью процесса заполнения петли.

В автоматических устройствах подготовки и ввода пробы (и в автоматических инжекторах) роль петли играет сама игла (рис. 1.12). Устройство работает по следующему циклу: промывка (чистым элюентом), промывка (пробой), отбор (известного количества пробы) и ввод.

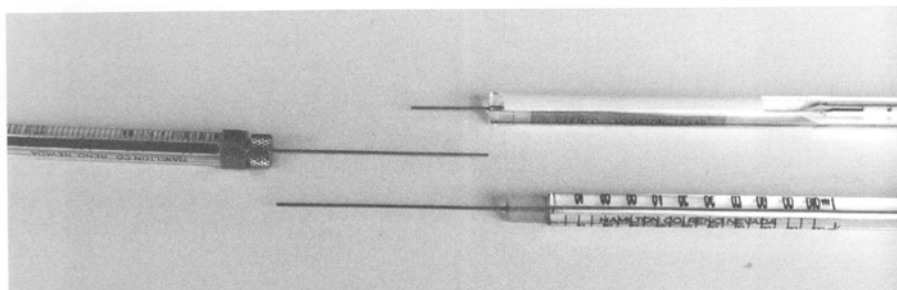


Рис. 1.11. Шприц-дозатор должен соответствовать каналу инжектора. Следует обратить внимание на различия в длине и форме. Шприцы предназначены для инжекторов разных фирм-изготовителей и не являются взаимозаменяемыми.

Обратите внимание, что применение таких инжекторов предполагает использование дополнительного флакона с промывным растворителем. Этот растворитель должен быть химически совместим и допускать смешение как с веществом пробы, так и с подвижной фазой. Автоматические инжекторы отличаются превосходной точностью и сходимостью (часто не хуже 0,2 %). Современные модели автоматических устройств подготовки и ввода пробы могут с высокой точностью выполнять разведение пробы, добавление реактивов, нагревание или охлаждение пробы перед вводом. Хотя автоматические инжекторы и автоматические устройства подготовки и ввода пробы дороги, достигаемая с их помощью автоматизация весьма ценна, поскольку освобождает хроматографа от постоянной рутинной работы.

Пробы могут содержать микрочастицы или растворимые компоненты, которые необратимым образом загрязняют колонку. Такого рода примеси приводят к быстрому ухудшению параметров колонки. Зачастую достаточно предварительно профильтровать пробу, чтобы удалить микрочастицы. Выбор материала фильтра определяется его совместимостью с растворителем пробы. Важно также, чтобы корпус фильтра был выполнен из химически инертного материала. Дополнительным критерием применимости того или иного фильтра для данного вида анализа является уверенность в полноте прохождения через него анализируемых веществ. Такая уверенность должна быть доказанной экспериментально, а не умозрительной.

Иной способ удаления примесей, взвешенных или растворённых в пробе, состоит в применении *защитной предколонки* (далее – просто «предколонки»). Предколонку, которая является своего рода коротким продолжением аналитической колонки, помещают между инжектором и колонкой. Предколонка, заполненная тем же по размеру и составу материалом, что и аналитическая, защищает последнюю от примесей, содержащихся в пробе.

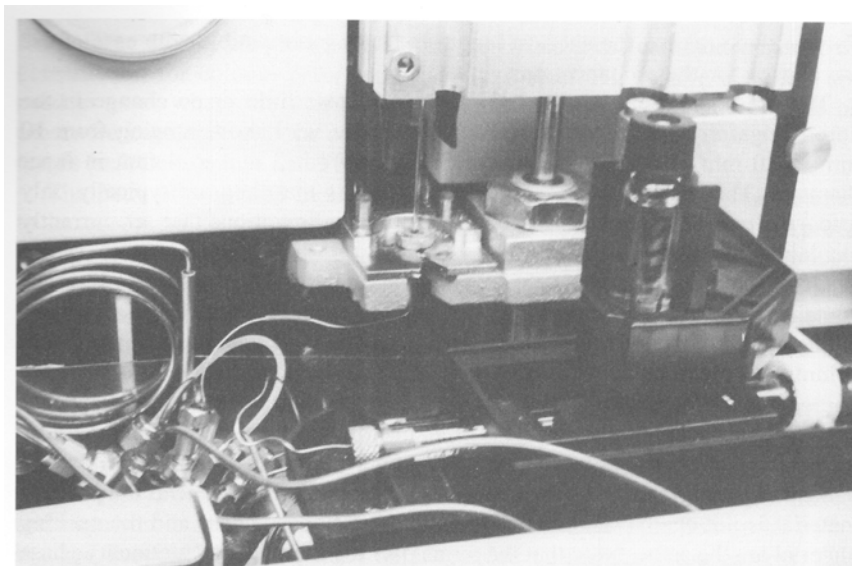


Рис. 1.12. Автоматический инжектор. Манипулятор переносит флакон с пробой (справа) в инжектор. Игла показана посредине сзади, шприц – посредине снизу.

Некоторые изготовители выпускают сборки, в которых предколонка навинчивается на аналитическую или ввинчивается в неё.

Предколонку присоединяют к инжектору капиллярной трубкой из нержавеющей стали, как правило, малого диаметра (например, 0,18 мм). Таким же капилляром предколонка присоединяется к колонке, а та – к детектору. В этих соединениях применять капилляры большего диаметра нерационально, поскольку это приводит к увеличению «мертвого объёма» системы, а значит, к снижению общей эффективности. По этим же соображениям стараются делать эти капилляры как можно короче, лишь бы это не затрудняло обращение с ними.

Наличие предколонок слабо сказывается или вовсе не сказывается на хроматографических параметрах, поскольку в большинстве случаев они имеют крайне малую длину – от 10 мм до 30 мм – и внутренний диаметр – от 2 мм до 4 мм. Преимущество использования предколонок в том, что она, как правило, в 5 – 20 раз дешевле аналитической. Примеры выпускаемых в настоящее время предколонок показаны на рис. 1.13.

Когда проба попадает в колонку, она взаимодействует с *набивкой* (*сорбентом*) – особым материалом, содержащимся в колонке (аналогичным материалом заполнены насыщающая колонка и предколонка).

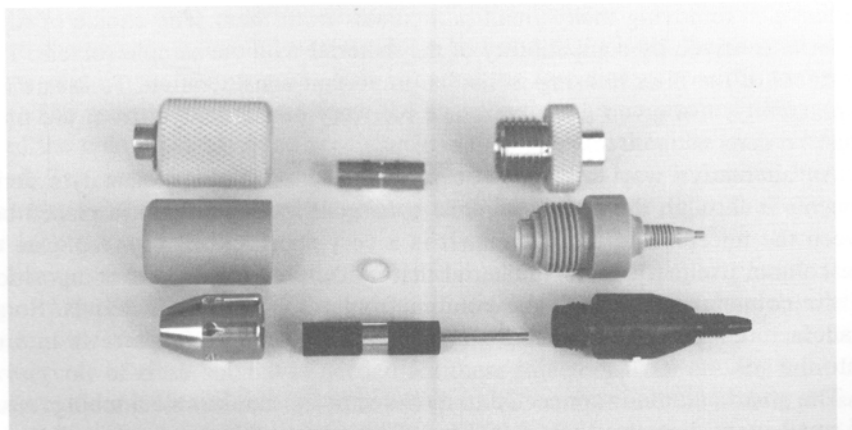


Рис. 1.13. Три варианта исполнения защитных предколонок. Вверху – обычная колонка патронного типа в держателе. Посредине деталь, напоминающая фритту, на самом деле является гофрированной фторопластовой пластинкой с набивкой. Внизу – колонка особого патронного исполнения, которая вставляется в специальный держатель.

Более чем в 75 % случаев в настоящее время набивкой является материал на основе пористого сферического силикагеля. Хотя в некоторых случаях силикагель используется как набивка без дополнительной обработки, в большинстве случаев он подвергается химической модификации, чтобы получить поверхности с весьма различными полярностью и функциональными группами. Функциональные группы, привитые к поверхности, называются в совокупности *неподвижной фазой*. Если материал набивки не подвергался химической модификации, то неподвижная фаза и набивка – одно и то же. Однако термины «набивка» и «неподвижная фаза» не следует путать.

Набивку помещают в трубку определённых длины и внутреннего диаметра. По обоим концам трубки имеются особые концевые фитинги, удерживающие набивку внутри. Набивка и металлические детали в совокупности образуют колонку. Именно в колонке происходит хроматографическое разделение. Хотя конструкция и внешний вид колонок разных изготовителей могут различаться достаточно сильно, многие их детали совпадают. На рис. 1.14 показаны трубки для колонок типичных диаметров. Чаще всего детали колонки выполняют из нержавеющей стали марки 316. Другие материалы используют в тех случаях, когда сталь разрушается (коррозионно-активной подвижной фазой) или мешает процессу разделения и количественного определения. К таким материалам относятся титан и ПЭЭК.

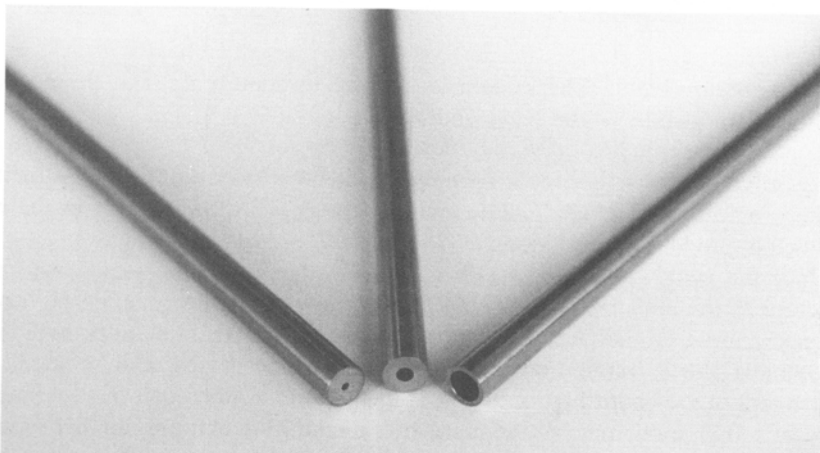


Рис. 1.14. Трубки для колонок наружным диаметром 6,35 мм (1/4 дюйма) с различными внутренними диаметрами. Слева направо: 1,0 мм (микротрубка); 2,1 мм (тонкая трубка); 4,6 мм (аналитическая).

Колонка состоит из двух концевых фитингов (с их помощью колонка подключается в систему, они также образуют герметичное обжимное соединение), двух фритт (пористых, проницаемых для подвижной фазы, но удерживающих набивку в колонке), трубки (цилиндра, внутри которого содержится набивка) и собственно набивки. Наилучшие хроматографические параметры дают трубки с наименьшей (микронной) шероховатостью торцов колонки и столь же высокой точностью их перпендикулярности оси.

То, как организован процесс заполнения колонки, по важности уступает, пожалуй, только выбору материала набивки. На рис. 1.15 показана незаполненная колонка, присоединённая к приспособлению для заполнения суспензией с подачей снизу вверх. Для заполнения колонки материал набивки смешивают с растворителем, дегазуют с образованием суспензии (так, чтобы не происходило комкования, и материал набивки оставался во взвешенном состоянии в течение всего процесса) и заливают в резервуар, который затем герметически закрывается, чтобы исключить утечку при повышении давления.

Набивочный насос заполнен *вытесняющей жидкостью* или набивочным растворителем. Резервуар с суспензией присоединён к насосу через отсекающий клапан. При закрытом клапане осуществляется нагнетание с помощью насоса до достижения требуемого для заполнения колонки давления.

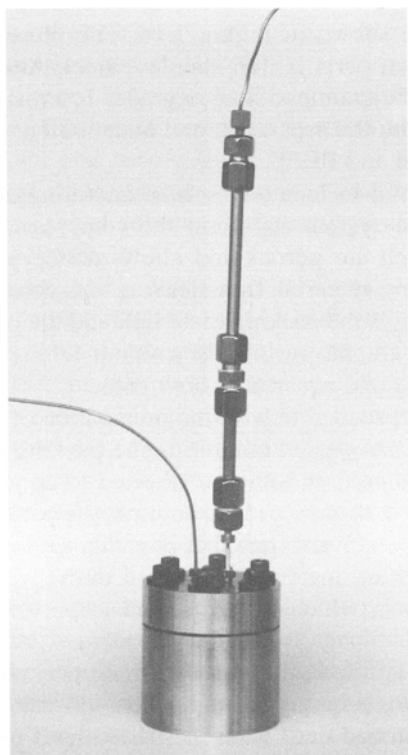


Рис. 1.15. Приспособление для заполнения колонки: традиционная конструкция с подачей суспензии снизу вверх. Набивочная головка – внизу показан узел из двух частей, соединённых винтами. Слева – входной патрубков с трубопроводом от насоса. Вверху над головкой – заполняемая колонка, над ней – трубопровод для сброса отработанного материала. Конструкция выдерживает давление свыше 70 МПа (10 000 фс/дюйм²).

В зависимости от размера зёрен материала набивки и длины и внутреннего диаметра колонки, это давление может быть от 35 МПа (5000 фс/дюйм²) до 105 МПа (15 000 фс/дюйм²) и выше. Затем клапан открывают, и высокое давление быстро проталкивает материал набивки в колонку. Систему выдерживают до уравнивания, набитую колонку снимают и устанавливают на неё второй концевой фитинг.

Для обеспечения воспроизводимости при заполнении колонок важно контролировать ряд переменных: давление при заполнении, продолжительность, плотность растворителя в суспензии, уровень материала набивки в суспензии, объём резервуара, а также использовать один и тот же растворитель в качестве вытесняющей жидкости.

Структура материала набивки после заполнения колонки называется *уплотнённым слоем*. С заполненной колонкой следует обращаться крайне осторожно, чтобы не нарушить уплотнённый слой. Не допускаются

механические удары, резкие повышения и понижения расхода, демонтаж или подгонка концевых фитингов и фритт. Если колонка нуждается в ремонте (например, замене фритты), в процессе демонтажа фритты и её замены необходимо свести к минимуму перемещение концевого фитинга, примыкающего к фритте. В некоторых случаях при замене происходит высыпание части материала набивки, вследствие чего колонка нуждается в дозаполнении. При этом надлежит использовать в точности такой же материал набивки.

В настоящее время используют две принципиально различные конструкции фитингов колонок. Классическая конструкция концевого фитинга с обжимным соединением (рис. 1.16) включает муфту, фритту, гайку и обжимную втулку (цельную или двухкомпонентную). Фритта находится внутри фитинга и может быть съёмной или несъёмной. Материал фритты может занимать всё сечение или находиться в оболочке (рис. 1.17).

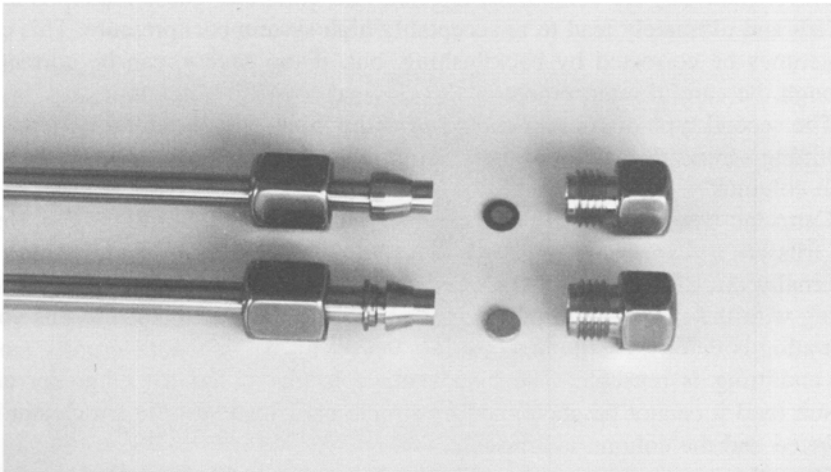


Рис. 1.16. Колонки с обжимным соединением концевых фитингов. Вверху: цельная втулка, фритта в оболочке. Внизу: двухкомпонентная втулка и обычная фритта.

Герметичность соединения трубки колонки с концевым фитингом по высокому давлению достигается обжимом втулки вокруг трубки при свинчивании гайки с муфтой. При этом фритту устанавливают заранее, так что в процессе монтажа обеспечивается надлежащее расстояние. Поверхность контакта обжимной втулки с трубкой создаёт герметичное соединение, не допускающее течи. Вследствие этого в некоторых случаях после использования колонки оказывается, что на внешней поверхности трубки между

втулкой и гайкой концевого фитинга образуется тончайший слой материала набивки. Обычно на хроматографические параметры это не влияет (если, конечно, в соединении нет утечки элюента или материала набивки). А вот просачивание набивки наружу между концевым фитингом и трубкой колонки является признаком неисправности, которую следует незамедлительно устранить.

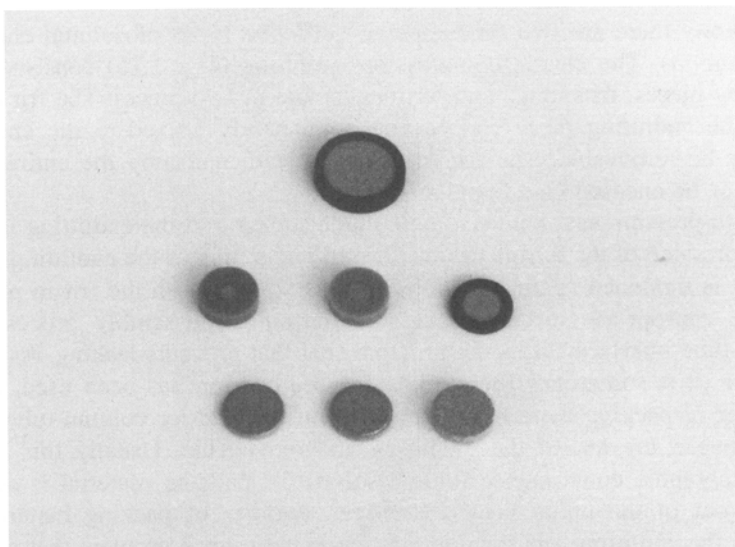


Рис. 1.17. Фритты. Вверху: фритта из нержавеющей стали в оболочке, наружный диаметр 7,5 мм; посередине: фритты из нержавеющей стали различного внутреннего диаметра и толщины в оболочке, наружный диаметр 4,6 мм; внизу: фритты из нержавеющей стали различной толщины, наружный диаметр 4,6 мм.

Недостаток обжимного соединения состоит в том, что при обжиме втулки вокруг трубки колонки последняя деформируется внутрь и воздействует на уплотнённый слой. Чаще всего этим можно пренебречь, однако, если трубка тонкостенная или при сборке концевого фитинга был приложен слишком большой крутящий момент, этот фактор может привести к нежелательным последствиям. Деформирование трубки с набивкой вызывает нарушение уплотнённого слоя, а значит, ухудшение параметров колонки. Следует также помнить, особенно при подготовке заказа, что муфты фитингов выпускаются как с наружной, так и с внутренней резьбой (рис. 1.18).

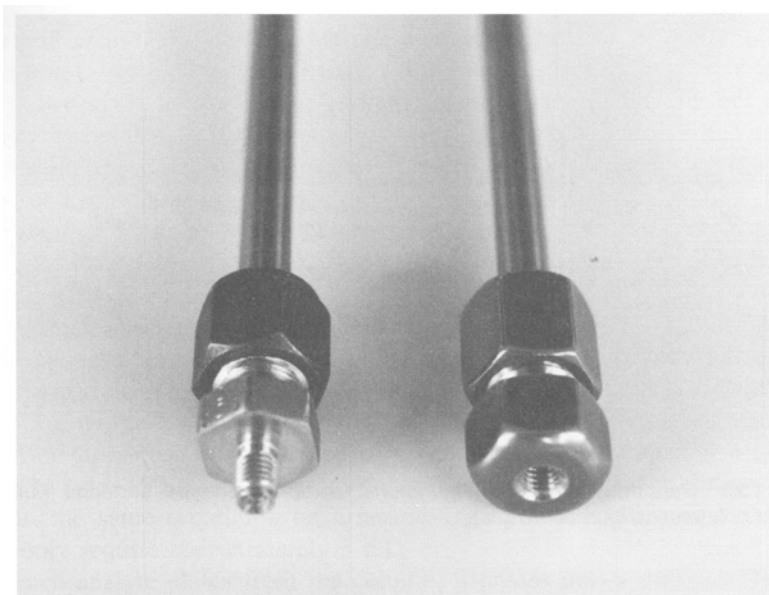


Рис. 1.18. Концевые фитинги с обжимным соединением: с наружной резьбой (слева) и с внутренней резьбой (справа).

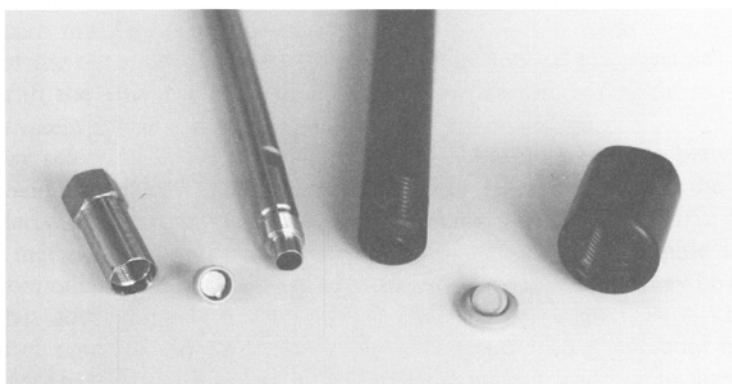


Рис. 1.19. Концевые фитинги при наличии резьбы на колонке: гайка из нержавеющей стали с насадной фриттой в оболочке (слева); гайка из ПЭЭК с уплотнительным кольцом и фриттой в оболочке из ПЭЭК (справа).

Преимуществом обжимного соединения является простота замены фритты. Время от времени в колонку попадают загрязнённые пробы (с примесями микрочастиц и нерастворимых веществ). Примеси засоряют фритту, что приводит к недопустимому повышению перепада давления в системе. Иногда эту неисправность удаётся устранить обращением потока, если же это не помогает, необходимо, очень аккуратно, заменить засорившуюся фритту на новую.

Второй вариант конструкции концевой фитинга колонки – резьба на самой трубке колонки. В этом случае фитинг навинчивается непосредственно на трубку. Две такие колонки показаны на рис. 1.19.

Серийно выпускаются также колонки патронного (картриджного) типа (рис. 1.20). В этом случае фритты запрессованы в трубку колонки. На трубке имеется наружная резьба, на которую навинчивается цельный концевой фитинг. Плотность соединения обеспечивается контактом фитинга с поверхностью фритты и трубки. Преимущество такой конструкции в том, что колонка получается более дешёвой, поскольку фитинги могут использоваться многократно. Недостаток – в том, что в случае засорения фритты по любой причине (и невозможности устранения засорения обращением потока), колонка дальнейшему использованию не подлежит, поскольку заменить фритту невозможно.

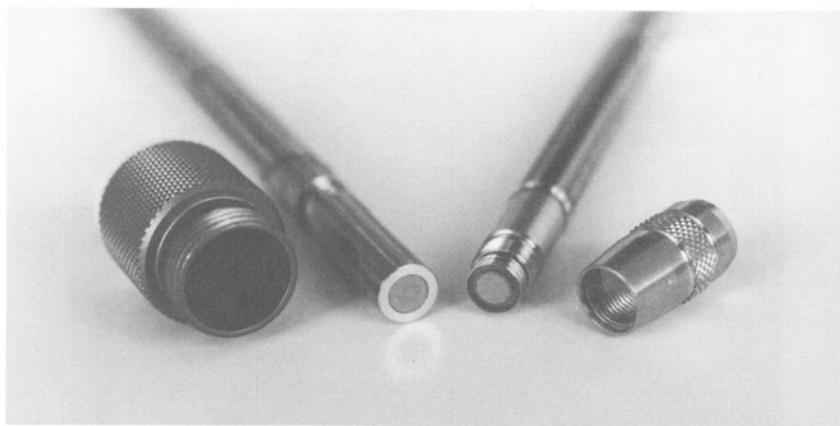


Рис. 1.20. Колонки патронного типа: с обжимным соединением (слева) и с наружной резьбой (справа).

И еще один компонент может быть добавлен в конструкцию колонки. Ближайшее рассмотрение процесса начала разделения показывает, что проба после прохождения через входную фритту попадает на вход колонки «точечно». И хотя фритта способствует радиальному распределению пробы, этот процесс не всегда является достаточно эффективным. Это приводит к возникновению двух проблем. Во-первых, это вызывает неравномерное распределение пробы в начале колонки, что приводит к искажению формы хроматографических пиков. Во вторых, неэффективное использование всей поверхности входной фритты приводит к более быстрому её засорению.

Для обеспечения радиального распределения пробы известны два подхода. Первый заключается в том, чтобы выполнить в фитинге небольшую коническую выточку. Благодаря ей проба быстро расширяется непосредственно перед попаданием на фритту. Второй – в том, чтобы поместить между фитингом и фриттой очень тонкий диск-распределитель (рис. 1.21, зачистую это сочетается с выполнением выточки). Диск-распределитель распределяет пробу в радиальном направлении, поскольку давление на его каналах снижается. Соответственно, перед попаданием на фритту поток пробы приобретает звездчатую форму.

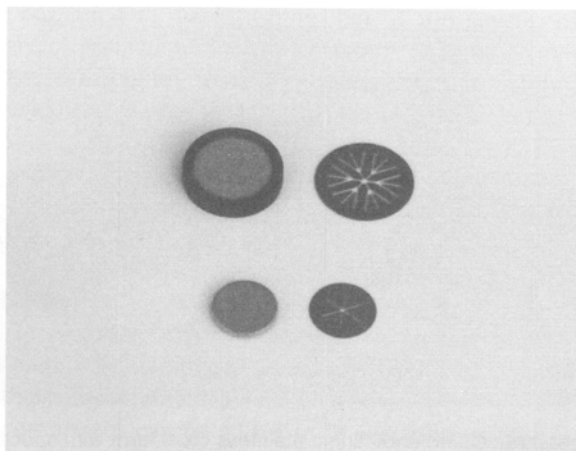


Рис. 1.21. Фритты (слева) и соответствующие диски-распределители (справа).

Пройдя концевой фитинг, проба попадает на набивку (сорбент). Именно здесь и происходит разделение. Аналиты пробы имеют различное сродство к паре подвижная фаза – неподвижная фаза. Для конкретной пары подвижная/неподвижная фаза эти различия заставляют аналиты по-разному

распределяться между подвижной и неподвижной фазой воспроизводимым образом. Соответственно, при движении подвижной фазы вдоль колонки, каждый аналит перемещается по колонке с разной (неповторяющейся) скоростью и выходит из колонки в определённый хорошо воспроизводимый момент времени.

Хотя общее время удерживания того или иного вещества и специфика его отделения от остальных определяется в основном составом подвижной фазы, колонка также определяет характер разделения. Размеры колонки зависят от сферы применения и определяются объёмом вводимых проб. В таблице 1.1 приведена классификация колонок по применению, в соответствии с их размерами, диаметрами зёрен (d_p), расходами (F), объёмами проб. От размера колонки зависит также, какое количество подвижной фазы расходуется в одном анализе. Например, если в общем случае для разделения, то есть элюирования всех аналитов, на колонке диаметром 4,6 мм, длиной 150 мм требуется 20 мл элюента, то для разделения тех же аналитов на тонкой колонке диаметром 2,0 мм длиной 150 мм потребуется лишь 8 мл.

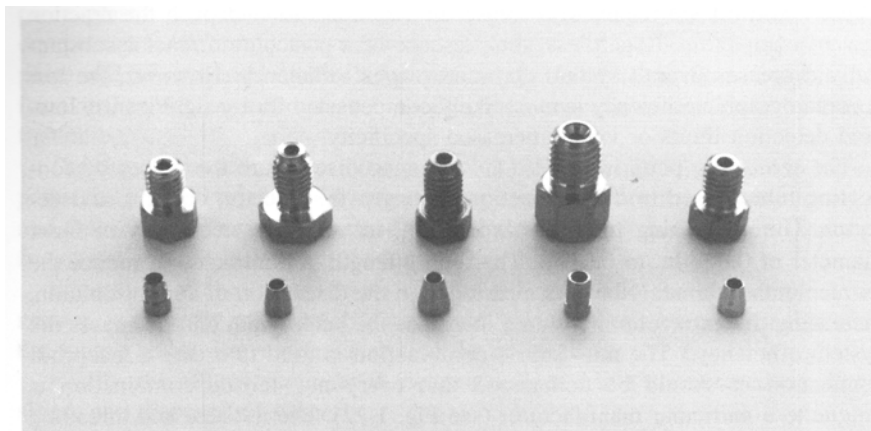
Выходящие из колонки аналиты с током элюента попадают в *детектор*. Детектор выбирают так, чтобы его отклик на каждый из аналитов был оптимальным. Детектор называют *универсальным*, если он даёт отклик на любое из проходящих по нему веществ. Таким, например, является рефрактометрический детектор. Другие детекторы реагируют на специфические свойства некоторого соединения или класса соединений. Например, спектрофотометрический детектор ультрафиолетового (УФ) диапазона реагирует на хромофоры, поглощающие свет на определённых длинах волн, электрохимический детектор измеряет силу тока, возникающую при окислении или восстановлении вещества на электроде, имеющем определённый потенциал. Рефрактометрический детектор и спектрофотометрический детектор УФ и видимого диапазона (УФВ) описаны подробно в главе 3.

Несколько детекторов могут быть включены последовательно, т.е. друг за другом. Чтобы обеспечить корректную работу, необходимо располагать неразрушающие детекторы (например, флуориметрический) до разрушающих (например, масс-спектрометрического) и следить за тем, чтобы ни на одном из детекторов не был превышен допустимый перепад давления. Кроме того, если возможно, следует ставить первым детектор с наименьшим размером кюветы. Это способствует повышению общей эффективности системы.

Таблица 1.1. Классификация хроматографических колонок и типичные параметры

Класс	Применение	Внутренний диаметр, мм	Длина, см	d_p , мкм	Масса пробы	Объём пробы	F_r , мл/мин	N/m^*
Микро- колонки	Количественное определение	< 1	≥ 25	< 2	< 100 нг	≤ 1 мкл	$< 0,05$	$> 250\,000$
Тонкие колонки	То же	2 – 3	3 – 30	1,5 – 5	10 нг – 10 мкг	1 мкл – 10 мкл	0,05 – 2	$> 100\,000$
Аналитические	То же	3,5 – 5	5 – 30	3 – 10	1 мкг – 10 мг	5 мкл – 50 мкл	0,5 – 5	40 000 – 150 000
Полупрепаративные	Мелкомасштабная промышленная очистка	5 – 25	10 – 100	10 – 50	10 мг – 1 г	100 мкл – 10 мл	2 – 100	$< 20\,000$
Препаративные	Крупномасштабная промышленная очистка	> 25	> 25	> 20	> 50 г	> 20 мл	> 100	< 5000

* N/m (число теоретических тарелок на метр) используется для оценки эффективности колонки: эффективность колонки тем выше, чем больше значение N/m .



А

Рис. 1.22. (А) Гайки (верхний ряд) и обжимные втулки (нижний ряд). Слева направо: изделия фирм Реодайн, Уотерс, Валко (Valco), Эс-эс-ай, Паркер (Parker) (продолжение на следующей странице).

В некоторых особых случаях между колонкой и детектором помещают *постколоночный реактор*. Его назначение – преобразовать аналит в производное или комплексное соединение, с целью повышения чувствительности методики, снижения порога обнаружения, устранения помех от других компонентов, присутствующих в пробе. Основным элементом реактора может быть насос, вводящий с постоянной скоростью реактивы в поток. Химическая реакция или комплексообразование с аналитом происходят в трубопроводе между тройником реактора (с помощью которого поток от насоса реактора вводится в поток от колонки) и детектором.

В тех случаях, когда постколоночная реакция получения производных (постколоночная дериватизация) протекает слишком медленно, чтобы завершиться или достичь установившегося уровня полноты до детектора, необходим дополнительный этап. Здесь постколоночный реактор может быть снабжён нагреваемым змеевиком или интенсивным источником излучения, благодаря которым скорость реакции повышается, и реакция смещается в сторону завершения. Независимо от этого, наличие постколоночного реактора приводит к заметному снижению общей эффективности хроматографической системы. Однако потерю эффективности компенсирует значительное снижение порога обнаружения или повышение специфичности метода анализа.

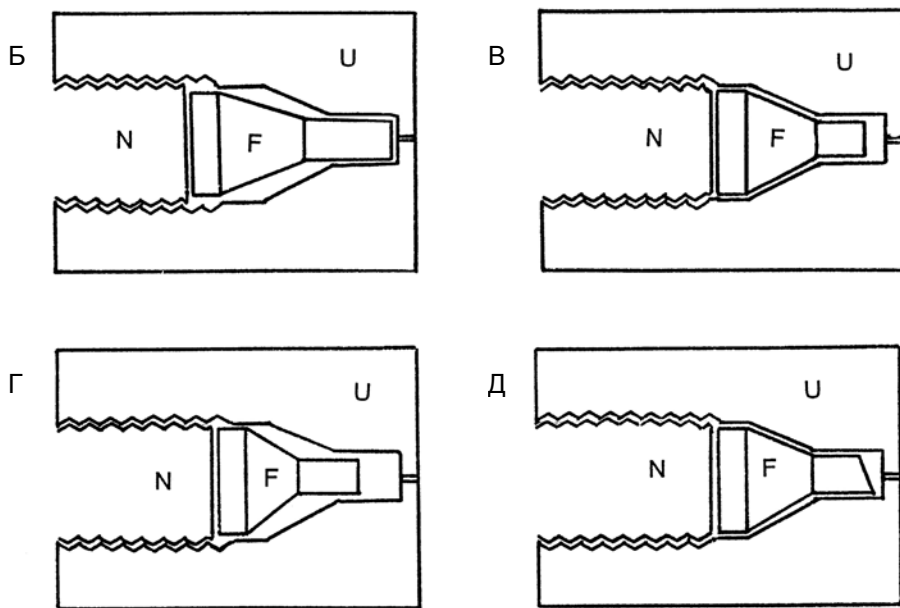


Рис. 1.22. (продолжение) (Б) Если втулка установлена неверно – возможна течь. (В) Если трубка размещена неверно образуется внеколоночная полость. (Г). Неверный выбор втулки обуславливает возможную течь и образование внеколоночной полости. (Д). Неверно отрезанная трубка (т.е. не под прямым углом к муфте) приводит к образованию внеколоночной полости.
N – гайка; F – втулка; U – муфта.

Из числа компонентов аппаратуры для ВЭЖХ осталось рассмотреть трубопроводы между инжектором, колонкой и детектором и элементы их соединения. Чаще всего для соединения используют трубки из нержавеющей стали наружным диаметром 1,59 мм (1/16 дюйма), внутренним диаметром от 0,18 мм (0,007 дюйма) до 0,25 мм (0,01 дюйм), т.е. капилляры. Длина трубопроводов должна быть как можно меньше, чтобы свести к минимуму внеколоночный объём (как уже говорилось при рассмотрении послеколоночных соединений, чем больше внеколоночный объём, тем больше размывание пиков и тем ниже эффективность системы). Для герметизации соединений используют конструкцию с обжимной втулкой и гайкой. Следует иметь в виду, что втулки и гайки разных изготовителей различаются (рис. 1.22). Размеры гайки, её резьбы, фаски обжимной втулки также могут быть различными. Кроме того, в разных узлах гайка-втулка трубка колонки выступает за торец втулки на разное расстояние. Соответственно, гайки и

штулки фирмы Уотерс (Waters) не подходят к муфтам фирм Реодайн (Rheodyne) или Эс-эс-ай (SSI). На рис. 1 22 Б–Д показано, к чему могут привести ошибка при установке обжимной штулки или попытка использовать не согласующиеся друг с другом детали.

Преимущество узла гайка-штулка из нержавеющей стали в том, что при правильном монтаже соединение остаётся герметичным до давлений 40 МПа (6000 фс/дюйм²) и выше. Для затяжки соединения с обжимной штулкой нужно использовать гаечный ключ. Не следует, однако, прилагать избыточных усилий, поскольку это может привести к заеданию и другим неисправностям соединения. После установки штулка демонтажу не подлежит. При необходимости заменяется весь узел.

Чтобы дать заказчикам возможность не хранить множество запасных частей и уберечь их от опасности что-то перепутать, некоторые фирмы начали изготавливать цельные и двухкомпонентные узлы гайка-штулка из пластмассы (рис. 1.23). Такая обжимная штулка при монтаже принимает форму полости в муфте. Соответственно, узел совместим с любыми муфтами. Кроме того, герметичность соединения обеспечивается даже при затяжке вручную.

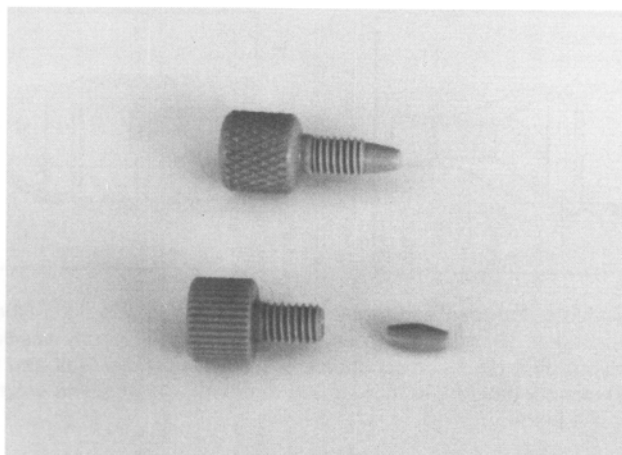


Рис. 1.23. Цельный (вверху) и двухкомпонентный (внизу) фитинги из ПЭЭК.

Недостатком таких фитингов является то, что они, как правило, рассчитаны на более низкие давления (до 28 МПа (4000 фс/дюйм²), что, впрочем, достаточно для обычных аналитических опытов), а также то, что резьба на пластмассе может быть сорвана, если неправильно наживить муфту, при этом пластмассовая стружка попадёт на фритту колонки.

Независимо от того, какие фитинги используются, соединение нужно собирать очень тщательно, чтобы они были герметичны, и между элементами и трубками не возникал «мертвый» объём.

На последней стадии вещество из детектора поступает в ёмкость для отработанного элюента, классифицируется и утилизируется надлежащим образом.

Все перечисленные компоненты необходимы для того, чтобы правильно организовать работу и получать результаты с высокими точностью, скоростью и воспроизводимостью.

ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ, ПАРАМЕТРЫ, ПЕРЕМЕННЫЕ И ТЕОРИЯ

2.1. Процесс разделения, образование пиков, получение хроматограммы

Понять процесс удерживания в ВЭЖХ несложно. В случае хроматографирования одного вещества время удерживания его в колонке определяется в основном соотношением времени, которое это вещество проводит в подвижной фазе, и времени, в течение которого оно связано с поверхностью. Два предельных случая таковы:

1. Аналит совершенно не взаимодействует с поверхностью, то есть не удерживается. Внутренний объем колонки за вычетом объема сорбента и объемный расход и определяют *время удерживания* этого вещества. Указанный объем состоит из объема в каналах между частицами материала набивки и объема пор в этих частицах.
2. Вещество сильно взаимодействует с поверхностью материала набивки. Оно может быть *необратимо адсорбировано* и вовсе не покинуть колонку. Либо это вещество может быть так сильно связано с поверхностью, что выйдет только спустя очень долгое время. В этом случае пик столь широк, что элюирование занимает 20 – 30 мин и даже больше. Зачастую столь сильно удерживаемые компоненты дают пики, неотличимые от нулевой линии.

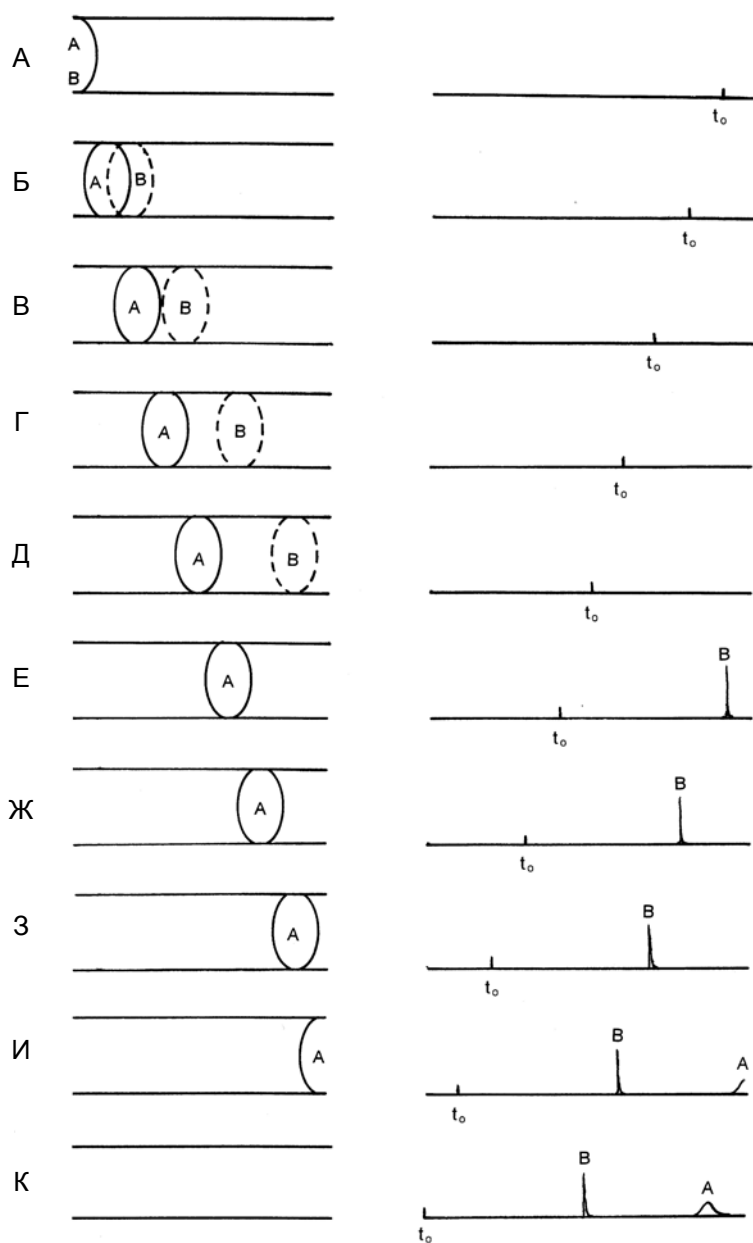
Идеальный с точки зрения хроматографии случай – когда время выхода анализируемого вещества больше, чем время выхода несорбируемого вещества, например пика растворителя, но достаточно мало с точки зрения практической осуществимости и эффективности анализа (скажем, не более 15 мин). Заметим, что чем больше количество пиков на хроматограмме, которые должны быть отделены друг от друга, тем больше это предельно допустимое время. Например, хроматографический опыт с разрешением двух пиков относительно нулевой линии зачастую укладывается менее, чем в 10 мин, а опыт с пятью пиками требует свыше 15 мин.

Рассмотрим подробнее случай с двумя растворёнными веществами в пробе. Пусть вещества А и В растворены в элюенте, введены в поток подвижной фазы и внесены в колонку. Время, которое А и В проводят в каждой из фаз, различается в зависимости от того, насколько соотношение сродства вещества А к подвижной и неподвижной фазам отлично от аналогичного соотношения для вещества В. Промежуток времени, проводимый веществом в той или иной фазе, определяется константой равновесия, зависящей от того, что это за вещество, а также от состава подвижной фазы и химических и физических свойств поверхности. Если поверхность не модифицирована (например, силикагель, окись алюминия), перенос между подвижной фазой и основой называется *адсорбцией*. Если на поверхности имеется привитая фаза (например, октил, октодецил) процесс переноса называется *распределением*. Разница между ними с практической точки зрения будет рассмотрена ниже.

В большинстве случаев разделения предполагается, что равновесие анализируемого вещества между подвижной фазой и поверхностью неподвижной фазы достигается быстро и является обратимым. Следовательно, удерживание каждого из веществ непосредственно связано с равновесной термодинамикой процесса распределения. Чем более благоприятны условия взаимодействия вещества с неподвижной фазой, тем больше времени, в среднем, оно проводит на неподвижной фазе, и тем больше время удерживания. Все переменные, влияющие на это равновесие, будут также влиять на время удерживания и параметры разделения. К таким переменным относятся температура, состав подвижной фазы, материал сорбента и растворитель, используемый при пробоподготовке (если он не совпадает с подвижной фазой).

После этого короткого вступления посмотрим, как происходит в колонке разделение компонентов А и В (рис. 2.1). Первоначально как А, так и В сосредоточены в начале колонки. По мере прохождения подвижной фазы по колонке, А и В начинают перемещаться вниз. Если параметры равновесий (подвижная/неподвижная фаза) А и В различны, А и В в процессе перемещения по колонке разделяются на две отдельные зоны.

Рис. 2.1. Разделение анализируемых веществ А и В. Положение зоны компонента в аналитической колонке показано слева (столбец «Колонка»). Соответствующие хроматограммы показаны справа. Здесь t_0 – момент ввода пробы в колонку. Этап А: А и В совместно вводятся в одну и ту же зону растворителя в голове колонки. Этапы от Б до Д: А проводит больше времени в набивке и меньше – в подвижной фазе, чем В, поэтому В перемещается вдоль колонки быстрее. Этап Е: В выходит из колонки в детектор, но А всё ещё полностью находится в колонке. Этапы Ж и З: А перемещается вдоль колонки. Этап И: А элюируется из колонки. Этап К: оба компонента полностью элюированы из колонки.



В данном случае В, в среднем, находится в подвижной фазе дольше, чем А, и поэтому обгоняет А при движении по колонке. В конце концов В полностью отделяется от А и начинает выходить из колонки, пока А ещё находится в ней.

Когда зоны разделяемых веществ выходят из колонки, они поступают в детектор и регистрируются как *пики*. Вся кривая, которую регистрирует детектор от момента ввода пробы в колонку до полного элюирования последнего компонента пробы, называется *хроматограммой*.

Время удерживания пика анализируемого вещества определяется однозначно девятью переменными:

1. Структура (строение) молекул разделяемых веществ.
2. Состав растворителя, в котором растворена проба.
3. Объём пробы.
4. Физические характеристики и химизм поверхности материала набивки.
5. Размеры колонки (т.е. длина и внутренний диаметр).
6. Состав подвижной фазы.
7. Температура в системе.
8. Скорость потока подвижной фазы.
9. Внеколоночный объём в системе (в большинстве случаев – объём инжектора, соединительных трубопроводов и детектора).

Существенно, что для получения приемлемых результатов хроматографии можно изменять некоторые или все эти переменные. Когда же их значения выбраны, и условия работы установлены (т.е. методика разработана и прошла валидацию), время удерживания и форма пика (профиль элюирования) должны быть воспроизводимыми. Постоянный контроль параметров, связанных с пиками, – важный процесс в оперативной оценке показателей хроматографической системы.

В идеале элюируемое анализируемое вещество даёт совершенно симметричный пик. На деле же пик чаще получается асимметричным, большая его часть находится после максимума (срез) или до максимума (фронт). Если отклонение формы пика от симметричной невелико и неизменно, результаты анализа можно считать правильными. Важнее то, что форма пика и любые её изменения многое могут сказать о том, что происходит в установке для ВЭЖХ. Нельзя забывать, что избежать ошибок можно, только если отслеживать любые отклонения от нормальных условий работы и результатов.

С учётом этого, хроматограммы характеризуются рядом параметров. Эти параметры помогают определить, воспроизводимо ли функционирова-

ние системы, как проходит разделение, не выходят ли характеристики системы за допустимые пределы. В зависимости от того, какая методика ВЭЖХ используется, может потребоваться текущий контроль одного или нескольких таких параметров. Для расчёта значений контролируемых параметров в хроматографии должны быть даны некоторые определения. Этому и посвящён следующий раздел.

2.2. Параметры, используемые для описания хроматограмм

Время удерживания несорбируемого компонента, t_0 . Время, за которое несорбируемое вещество (в случае эксклюзионной хроматографии – не подвергающееся разделению по размерам) проходит от инжектора до детектора. Определяется как время элюирования данного вещества путём опускания перпендикуляра из вершины пика на нулевую линию (рис. 2.2).

Время удерживания, t_r . Время, за которое компонент проходит всю систему от инжектора (момент ввода пробы принимается за $t = 0$) до детектора. Такое прохождение называется элюированием. Определяется путём опускания перпендикуляра из вершины пика на нулевую линию (рис. 2.2).

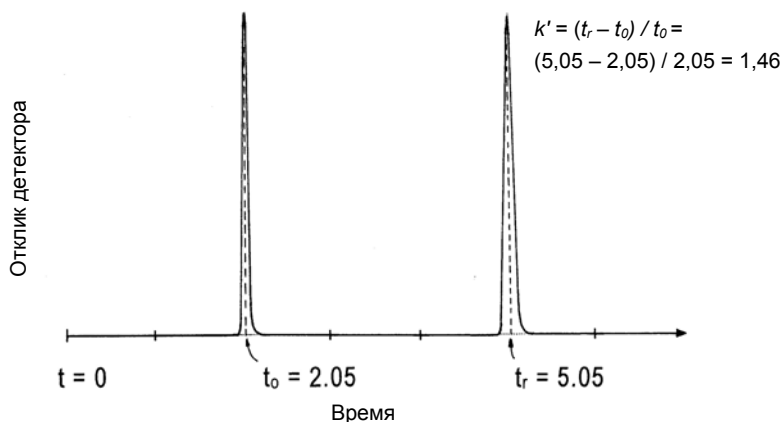


Рис. 2.2. Определение времени удерживания несорбируемого компонента, времени удерживания определяемого вещества и соответствующего коэффициента ёмкости.

Коэффициент ёмкости k' . Степень удерживания компонента, выраженная в кратности его времени удерживания к времени удерживания несорбируемого компонента по следующей формуле:

$$k' = (t_r - t_0) / t_0.$$

Для пика несорбируемого компонента $t_r = t_0$, и $k' = 0$. Порядок расчёта также показан на рис. 2.2.

Высота пика h_p . Расстояние от вершины пика до нулевой линии. Нулевая линия определяется как обычный отклик детектора в присутствии подвижной фазы, но при отсутствии пробы. Нулевая линия может быть горизонтальной, как при изократическом элюировании, или наклонной, как в некоторых градиентных режимах. Поскольку зачастую высота пика линейно зависит от содержания компонента, измерение высоты пика может быть использовано для количественного анализа веществ.

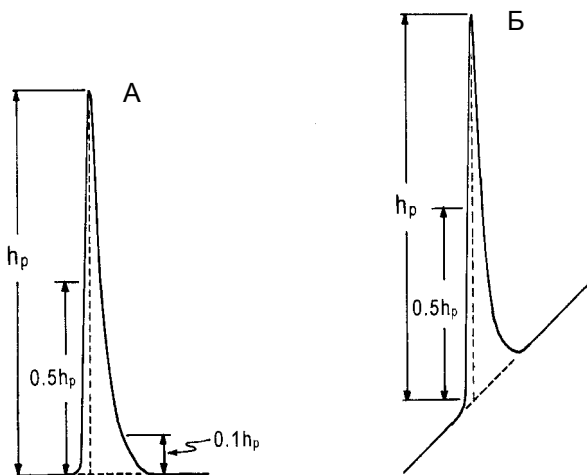


Рис. 2.3. Расчёт высоты пика h_p (в общем виде h_x). (А) показывает в общем виде форму нулевой линии в изократическом режиме, (Б) – в градиентном. В последнем случае значение $0,1 h_p$, если оно необходимо, получают путём оценки, поскольку наклон нулевой линии слишком велик для непосредственного измерения.

Используются также параметры, отражающие форму пика в нескольких точках. Так, определяются $0,1 h_p$ или $10\% h_p$ представляющие собой одну десятую высоты пика, измеренную от нулевой линии (рис. 2.3 А). Точка на половине расстояния от нулевой линии до вершины пика даёт полувысоту пика, $0,5 h_p$ ($50\% h_p$). В случае наклонной нулевой линии, высота пика определяется, как показано на рис. 2.3 Б.

Ширина пика w_x . Ширина пика измеряется на заданной высоте пика x . Так, ширина на половине высоты обозначается $w_{0,5}$ или w_{50} . Эти параметры редко применяются сами по себе. Ширина пика используется для определения и расчёта других важных хроматографических параметров, о чём будет сказано ниже.

Число теоретических тарелок N . Число теоретических тарелок колонки является показателем эффективности разделения. По определению,

$$N = 5,54(t_r / t_{w_{1/2}})^2,$$

где t_r – время удерживания, $t_{w_{1/2}}$ – ширина пика на половине высоты. Кроме того, N можно рассчитать по ширине пика на нулевой линии. Эта ширина измеряется между точками пересечения нулевой линии касательными, проведёнными в точках перегиба пика (рис. 2.4). Значение N при этом рассчитывается следующим образом:

$$N = 16(t_r / t_{wb})^2,$$

где t_r – время удерживания, t_{wb} – ширина пика на нулевой линии. Обратите внимание: при одном том же времени удерживания, чем меньше ширина пика (т.е., чем уже пик), тем больше число теоретических тарелок колонки. Иначе говоря, при прочих равных, чем больше N , тем эффективнее колонка.

С точки зрения контроля нормальной работы хроматографической системы, значение N крайне важно, поскольку оно зависит почти от **всех** параметров системы: состава подвижной фазы (поскольку состав влияет на t_r), типа, длины и внутреннего диаметра колонки (поскольку тип и размеры колонки также влияют на t_r), температуры (поскольку, как правило, чем выше температура T , тем меньше время удерживания t_r и ширина пика w), объёма пробы, всех внеколоночных объёмов хроматографической установки (трубопроводы, ячейка детектора и пр.). Впрочем, многие из этих параметров принимают неизменные значения на этапе начальной настройки аппаратуры, так что чаще N используется как характеристика именно колонки.

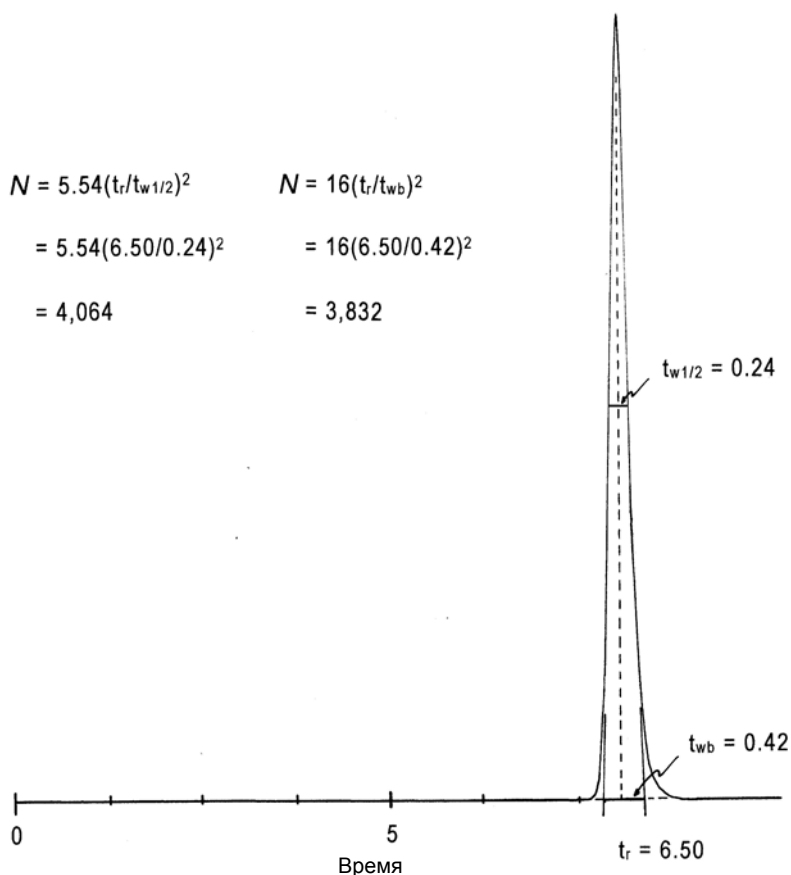


Рис. 2.4. Определение числа теоретических тарелок N . Ширина пика на половине высоты $x = 1/2$ обозначена $t_{w1/2}$. t_{wb} — измеряемая доля x высоты пика, t_{wb} — промежуток времени, измеренный на этой высоте. Расчёты с использованием $t_{w1/2}$ и t_{wb} дают близкие результаты, если пик узок и симметричен. Если пик имеет удлинённый срез («хвост»), расчёт с использованием $t_{w1/2}$ даёт гораздо большее значение N , чем с использованием t_{wb} . Соответственно, значение N по ширине пика на нулевой линии более чувствительно к изменению параметров колонки, чем по ширине пика на половине высоты.

Высота, эквивалентная теоретической тарелке ВЭТТ или N . N представляет собой длину участка колонки, на котором имеется одна теоретическая тарелка. С помощью этого параметра можно быстро сравнить эффективность колонок разных размеров, но с равными диаметрами зёрен

сорбента (например, 25 см × 4,6 мм и 30 см × 3,9 мм с сорбентом C₁₈ 5 мкм). H рассчитывается следующим образом:

$$H = L / N,$$

где L – длина колонки, N – число теоретических тарелок в колонке. Так, если в примере, показанном на рис. 2.4, $L = 10$ см, то $H = 10 \text{ см} : 4064 \text{ тарелки} = 2,46 \times 10^{-3} \text{ см/тарелка}$.

Приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке ПВЭТТ или h . Приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке, используется в хроматографии для сравнения эффективности (т.е. качества упаковки) колонок с разными диаметрами зёрен сорбента (например, 3 мкм и 5 мкм).

$$h = H / d_p,$$

где H – высота, эквивалентная теоретической тарелке, а d_p – диаметр зёрен сорбента. В рассмотренном примере диаметр зёрен 5 мкм даёт $h = (2,46 \times 10^{-3} \text{ см/тарелка}) : (5 \text{ мкм}) = (24,6 \text{ мкм/тарелка}) : (5 \text{ мкм}) = 4,92$.

Все приведенные выше параметры характеризуют эффективность колонки на основе времён удерживания и особенностей формы отдельных пиков. Их активно используют изготовители, чтобы указывать минимально допустимые значения в паспортных характеристиках. Однако эти параметры ничего не говорят о том, насколько хорошо колонка разделяет компоненты (это определяется не только эффективностью, но и селективностью колонки). Приведенные далее параметры используются для характеристики разделения, когда на хроматограмме имеются пики двух и более компонентов.

Степень разделения α . Данный параметр используется для характеристики разделения двух соседних пиков. В идеале эти пики не должны перекрываться, то есть должны быть разрешены до нулевой линии. Это условие выполняется для пиков сходной формы, если $\alpha > 1,15$. Степень разделения рассчитывается следующим образом:

$$\alpha = k'_2 / k'_1,$$

где нижние индексы показывают порядок выхода компонентов (рис. 2.5). При этом всегда $\alpha > 1$.

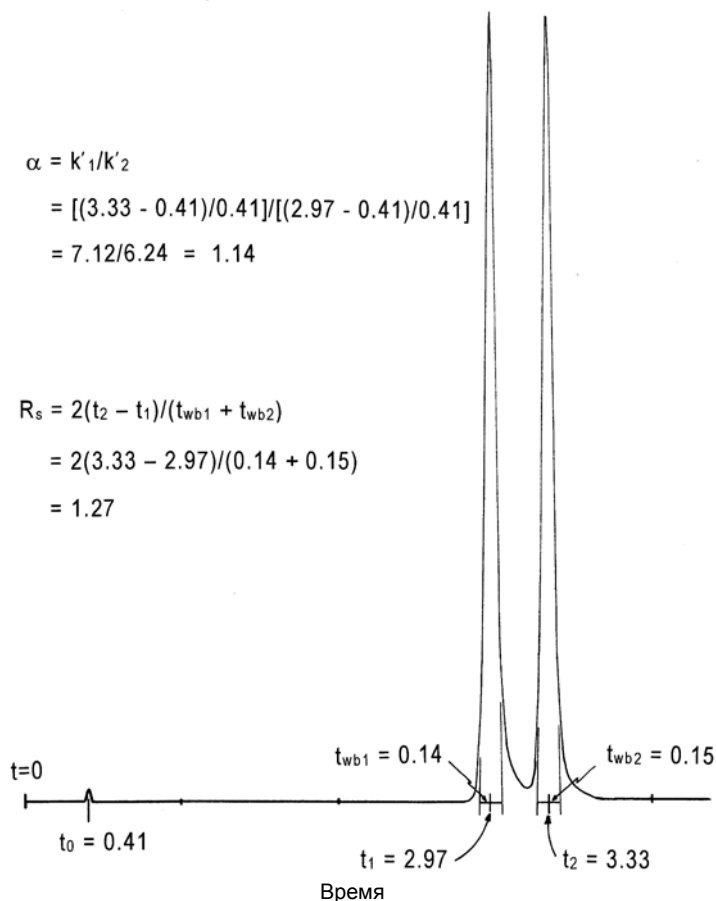


Рис. 2.5. Определение степени разделения α и разрешения R_s :

Разрешение R_s . Важный параметр хроматограммы более чем двух компонентов – расстояние между любыми двумя соседними пиками. Для его оценки может, например, быть использовано разрешение R_s , определяемое как

$$R_s = 2 \frac{t_2 - t_1}{t_{wb2} + t_{wb1}},$$

где t_1 и t_2 – времена удерживания первого и второго пиков, t_{wb1} и t_{wb2} , соответственно, – ширины этих пиков на уровне нулевой линии. Заметим, что такое же определение разрешения дано в Фармакопее США.

Разрешение также может быть выражено через собственные функциональные параметры колонки. Для этого используется следующее выражение:

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

где k – среднее арифметическое k'_1 и k'_2 (см. рис. 2.5). Первый множитель, $\sqrt{N}/4$, – мера эффективности системы. Вторым, $\alpha - 1$, – мера селективности разделения. Третий множитель, $k/(k+1)$, – мера удерживающей силы сорбента. Таким образом, R_s возрастает, если возрастает N (повышается эффективность колонки, то есть образуются более узкие пики), возрастает α (повышается селективность колонки, то есть избирательно увеличивается время удерживания одного из компонентов по сравнению с остальными) или возрастает k (общее время удерживания компонента увеличивается, остальные параметры не меняются). Наиболее сильно сказывается увеличение α , поскольку R_s зависит от α линейно. Разрешение также пропорционально корню квадратному из числа теоретических тарелок, т.е. эффективности колонки. Время удерживания существенно сказывается на разрешении, когда k мало, но, как правило, почти не влияет на α , если k больше 5. Заметим, что когда два пика выходят близко друг к другу, они характеризуются сходными значениями N , соответственно, можно определять N по любому из них. Если это не так, применяется меньшее из двух значений.

Разрешение R (в соответствии с Фармакопеей США). Величина R используется для оценки эффективности системы и определяется следующим образом [1]:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 - W_1},$$

где t_1 и t_2 – времена удерживания пиков, выходящих, соответственно, первым и вторым, W_1 и W_2 – ширины этих пиков, определяемые как расстояние между точками пересечения нулевой линии касательными, проведёнными через точки перегиба (см. рис. 2.5, где $t_{wb1} = W_1$, а $t_{wb2} = W_2$).

Коэффициент асимметрии A_s . Коэффициент асимметрии показывает, насколько форма пика отличается от нормального распределения. Нижний индекс x указывает, на какой высоте пика определяется асимметрия. Чаще

всего используются A_{10} (рассчитываемая на 10 % высоты пика) и A_5 (на 5 % высоты пика). Иногда в нижних индексах используются десятичные дроби, т.е. асимметрия на 10 % высоты пика обозначается $A_{0.1}$. Коэффициент асимметрии находят из выражения

$$A_x = b/a,$$

где b – расстояние от перпендикуляра, опущенного из вершины пика на нулевую линию, до конечной точки кривой, a – расстояние от перпендикуляра, опущенного из вершины пика на нулевую линию, до начальной точки кривой пика (см. рис. 2.6). Если спадающая часть пика (срез) длиннее

$$\begin{aligned} A_{10} &= b_{10}/a_{10} \\ &= 0.60/0.32 = 1.88 \\ A_5 &= b_5/a_5 \\ &= 0.77/0.36 = 2.14 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} T &= W_{0.05}/2f \\ &= 1.13/(2 \times 0.36) \\ &= 1.57 \end{aligned}$$

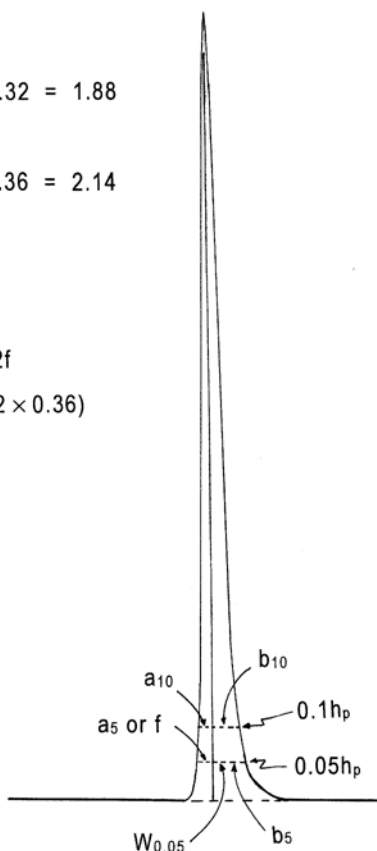


Рис. 2.6. Определение коэффициентов асимметрии A_x и коэффициента размытия T .

фронтальной, $Ax > 1$. Если фронт пика длиннее среза, $Ax < 1$. Для симметричного пика $Ax = 1$.

Коэффициент размытия T (в соответствии с Фармакопеей США). Этот параметр отличается от коэффициента асимметрии Ax и определяется на 5 % высоты пика (что обозначается десятичной дробью 0,05) как отношение общей ширины пика к удвоенной ширине фронта:

$$T = W_{0,05} / 2f,$$



Рис. 2.7. (А) Два пика хорошо разрешены на высококачественной колонке. Для упрощения восприятия нулевая линия под пиками показана пунктиром. (Б) Аналогичное разделение на той же колонке после длительного использования. Пики на хроматограмме (Б) несколько ниже, но их площади те же. Истинная форма среза первого пика показана пунктирной линией.

где $W_{0,05}$ – ширина пика на 5 % его высоты, f – расстояние от перпендикуляра, опущенного из вершины пика на нулевую линию, до начальной точки кривой пика (см. рис. 2.6). Если срез пика длиннее фронта, $T > 1$. Если наоборот, $T < 1$. Для симметричного пика $T = 1$.

Обратите внимание на то, что пики могут становиться асимметричными из-за плохого качества упаковки колонки или соединений капиллярами. Возможно, соединительный капилляр срезан не под прямым углом или резьбовые соединения не затянуты. Тогда возникает холостой объём, который плохо промывается подвижной фазой, соответственно, происходит внеколоночное размытие пиков. В особенно неудачных случаях пики могут расщепляться. Наконец, неплотные соединения могут просто протекать.

Размытие пика может сильно ограничить возможность определения времени удерживания и количественного содержания анализируемого вещества. Как правило, добиться удовлетворительной точности количественного определения можно, если соседние пики разрешены до нулевой линии. Этот случай показан на рис. 2.7 А. Здесь пик 1 достигает нулевой линии (т.е. соответствующее вещество полностью элюируется) до начала выхода пика 2. Пики имеют чёткую форму, значения как α (или R), так и A_x (или T) приемлемы, пики хорошо разрешены. На рис. 2.7 Б показан случай, когда значение α такое же, но A_x больше. Здесь хотя пики в общем разрешены, практически они перекрываются. Если в опыте предъявляются повышенные требования к количественному определению, такая хроматограмма может оказаться неприемлемой, поскольку значительная часть среза пика 1 выходит под пиком 2. Точность и правильность в таком опыте гораздо хуже, что заставляет принимать меры к устранению этого недостатка.

2.2.А. Основные уравнения, описывающие образование хроматографического пика и хроматографическое разделение

Когда проба вводится в колонку, анализируемое вещество (при упрощённом рассмотрении процесса) может находиться в двух местах – на поверхности сорбента или в подвижной фазе. По мере того, как растворённая проба перемещается вдоль колонки, имеет место длинный ряд последовательных процессов адсорбции – десорбции. Далее рассмотрены некоторые основные положения, связанные с процессом элюирования.

2.2.А.1. Изотерма адсорбции. Когда проба растворена в подвижной фазе, перемещающейся по неподвижной фазе, имеет место адсорбция

вплоть до достижения равновесия, пусть даже непродолжительного. Для описания этого события лучше всего воспользоваться изотермой. Хотя существует множество изотерм (в зависимости от того, как именно процесс описывается математически), чаще всего для несложных хроматографических разделений используют изотерму Ленгмюра. Рис. 2.8 иллюстрирует три возможных типа соотношений между концентрациями анализируемого вещества на поверхности сорбента C_s и в подвижной фазе C_m для данного сорбента.

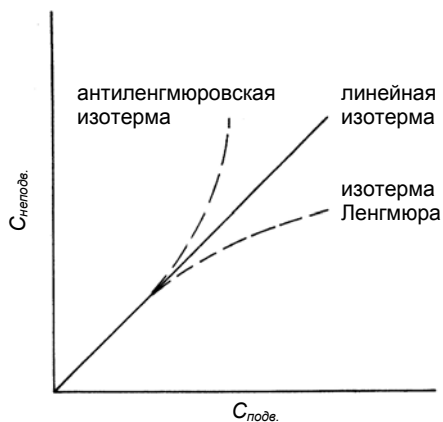


Рис. 2.8. Изотермы адсорбции. В идеале хроматографическое разделение должно осуществляться на линейном участке изотермы, поскольку при этом времена удерживания не зависят от концентрации анализируемого вещества.

1. Когда распределение растворённого вещества между поверхностью и подвижной фазой не зависит от концентрации данного вещества, изотерма является линейной (точнее, концентрация приходится на линейный участок изотермы адсорбции). Если никакие другие факторы не действуют, пик будет симметричным, а время удерживания – постоянным.
2. Диапазон концентраций, в котором при C_s растёт медленнее, чем C_m , называется изотермой *Ленгмюра*. Активные центры на поверхности насыщаются растворённым веществом, и его излишек остаётся в подвижной фазе. При дальнейшем росте концентрации доля молекул растворённого вещества, связанных с сорбентом, уменьшается, максимум пика смещается в сторону меньшего времени удержива-

ния. Одновременно не связанные с сорбентом молекулы выходят на срезе пика, удлинняя его.

3. В противоположность этому, изотерма может иметь нелинейный характер и когда сорбент фактически активируется при адсорбции растворённого вещества, то есть C_s растёт быстрее, чем C_m . Такая изотерма называется *антиленгмюровской*. В хроматографии это будет проявляться за счёт большей степени удерживания большего количества молекул растворённого вещества. Время выхода максимума пика возрастает, удлиняется фронт пика (более подробно этот вопрос рассмотрен в [2]).

2.2.A.2. Фазовое отношение. В привитофазных сорбентах имеется определённая область доступной поверхности с активными центрами, соответствующая доступному объёму. Точно так же подвижная фаза, соприкасающаяся с поверхностью, имеет некий доступный объём (именно в этих объёмах происходит перенос растворённого вещества из фазы в фазу). Соотношение этих объёмов называется фазовым отношением ϕ :

$$\phi = V_s / V_m ,$$

где V_s – объём поверхностных активных центров, а V_m – объём подвижной фазы.

Важность этого понятия определяется тем, что, с учётом изотермы адсорбции, коэффициент ёмкости выражается следующим образом:

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = \frac{\text{количество вещества на поверхности}}{\text{количество вещества в подвижной фазе}}$$

Это согласуется с вышеприведенным описанием процесса удерживания: когда растворённое вещество проводит больше времени в подвижной фазе, его относительная концентрация больше, чем в неподвижной фазе, и k' уменьшается. Когда же растворённое вещество проводит больше времени в неподвижной фазе, его относительная концентрация там больше, чем в подвижной фазе, и k' возрастает.

2.2.A.3. Уравнение Нокса. Уравнение Нокса представляет собой теоретическое описание процесса размытия хроматографической зоны. Для начала, представим себе, что бесконечно малый объём пробы введён в малую пустую трубку, ведущую непосредственно в детектор. Здесь наиболее сильно сказывается на размытии зоны (и пика) диффузия растворённого вещества от точки с наибольшей концентрацией. Это явление называется *продольной диффузией* и определяется химическим потенциалом между областями с разными концентрациями определяемого вещества.

Теперь заполним трубку пористым сорбентом. В результате появляется множество путей между зёрнами и внутри сорбента. Продольная диффузия по-прежнему имеет место, но теперь все пути имеют разные диаметры. К тому же, не совпадают ни длины путей, ни сопротивление потоку в них. Эти различия представляют собой другой источник размытия хроматографической зоны – так называемую *вихревую диффузию*.

Способствуют размытию зоны также явления, связанные с массопереносом. Эти явления можно представить себе, как обусловленные продолжительностью перемещения молекулы из точки *A* в точку *B* (как внутри фазы, так и между фазами). Далее описываются три варианта массопереноса.

Во-первых, происходит массоперенос растворённого вещества внутри подвижной фазы из одного пути потока на другой. Это называется *массопереносом в подвижной фазе*.

Во-вторых, имеет место массоперенос в области подвижной фазы между зёрнами набивки, которые не полностью промываются подвижной фазой, а также из этих областей. Это явление называют *массопереносом в застойных зонах подвижной фазы*. Следует помнить, что сюда относится не только межфазный процесс, но и процессы диффузии и массопереноса в самой подвижной фазе в застойных зонах.

Наконец, в сорбентах с большим количеством привитой фазы молекулы растворённого вещества переносятся в неподвижную фазу и из неё обратно в подвижную. Такой процесс называется *массопереносом в неподвижной фазе*. Как и в предыдущем случае, сюда относят также процессы диффузии и массопереноса в неподвижной фазе.

Опуская подробности, укажем лишь, что общая эффективность колонки в терминах высоты приведенной высоты, эквивалентной теоретической тарелке h (чем меньше h , тем более эффективна колонка и тем уже пики), описывается уравнением Нокса [3]:

$$h = Av^{1/3} + B/v + Cv,$$

где v – приведенная линейная скорость (т.е., отношение линейной скорости потока к коэффициенту диффузии анализируемого вещества в подвижной фазе), член A описывает вихревую диффузию, член B – продольную, член C – массоперенос.

Зависимость h от v , соответствующая данному уравнению, показана в общем виде на рис. 2.9. Обратите внимание на то, что наибольшая эффективность хроматографической системы достигается на минимуме кривой. К сожалению, такая оптимальная приведенная скорость потока, v_{opt} ,

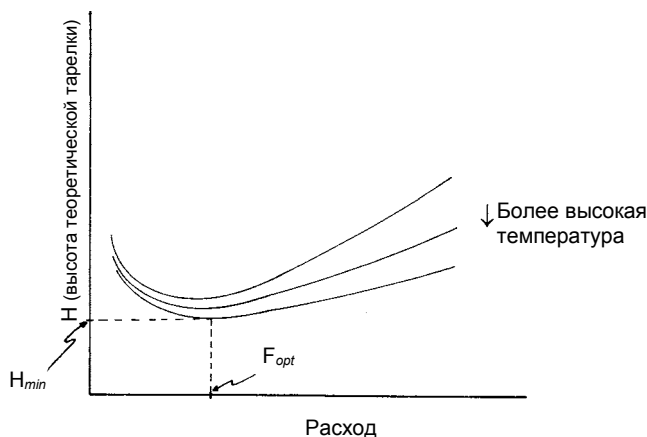


Рис. 2.9. Эффективность колонки, выраженная как зависимость высоты теоретической тарелки от расхода и температуры. За исключением крайне малых расходов (как правило, $\ll 0,1$ мл/мин), чем выше поток, тем ниже эффективность колонки. При повышении температуры уменьшается влияние массопереноса, общая эффективность повышается. Расход, при котором значение H меньше всего, H_{min} , называется оптимальным для хроматографии, F_{opt} .

как правило, на порядок меньше обычно используемых. При такой скорости повышение эффективности достигается за счёт существенного снижения пропускной способности по количеству проб. Заметим также, что чем выше температура, тем выше интенсивность межфазного переноса, соответственно, тем меньше сказывается влияние массопереноса. Благодаря этому эффективность системы повышается. Хотя это — не единственный фактор (ещё один — меньшая вязкость сорбента), он сильнее всего сказывается на том, что при более высокой температуре, как правило, можно получить пики лучшей формы, в особенности, если анализируемые вещества имеют большую молекулярную массу.

На размытие хроматографической зоны влияют и факторы, не являющиеся собственно хроматографическими. В частности, экспериментатор может повысить эффективность системы, уменьшая до минимума внеколоночный объём. Внеколоночный объём влияет на ширину пика, выраженную через *дисперсию*, σ^2 . Соответственно, каждый микролитр дополнительного объёма в системе между инжектором и детектором (даже если не учитывать влияние колонки, описанное выше) отрицательно сказывается на общей эффективности системы. В наиболее точных выражениях внеколоночный объём — это объём инжектора, всех соединительных

трубопроводов и детектора. Математически это выражается в виде суммы всех составляющих объёма (снова в терминах дисперсии или ширины пика):

$$\sigma_t^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{ct_1}^2 + \dots + \sigma_{ct_x}^2 + \sigma_{det}^2,$$

где t обозначает общий объём, inj – инжектор, ct_1 – первый участок соединительного трубопровода, ct_x – последний его участок, det – детектор. На рис. 2.10 показаны результаты для трубопроводов, совпадающих по длине, но различающихся по диаметру (то есть систем с разными внеколоночными объёмами). Обратите внимание на то, что в системе с большим внеколоночным объёмом второй и третий пики практически не разрешены до нулевой линии.

2.2.A.4. Параметры пика. Параметры пика используются для количественного описания профиля хроматографического пика. Поскольку на течение хроматографического процесса в ЖХ влияет главным образом диффузия, концентрация в любой точке описывается гауссовой функцией:

$$C = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-1/2(x/\sigma)^2}$$

где C – концентрация в точке x , σ – стандартное отклонение (ширина) пика. Отсюда определяются параметры пика, показанные в таблице 2.1. Подробнее этот вопрос рассмотрен в [4].

Таблица 2.1
Параметры пика с гауссовым распределением

Параметр	Наименование	Обозначение	Формула
Первый, M_0	Площадь пика	A	$\int_{x_1}^{x_2} C dt$
Второй, M_1	Время удерживания (центр масс)	t_r	$(1/A) \int_{x_1}^{x_2} C dt$
Третий, M_2	Дисперсия	σ^2	$(1/A) \int_{x_1}^{x_2} C t^2 dt - t_r^2$
Четвёртый, M_3	Удлинение на срезе (сдвиг по фазе) $M_3/M_2^{3/2}$	A_x или t	$(1/A) \int_{x_1}^{x_2} C (t^2 - t_r^2) dt$

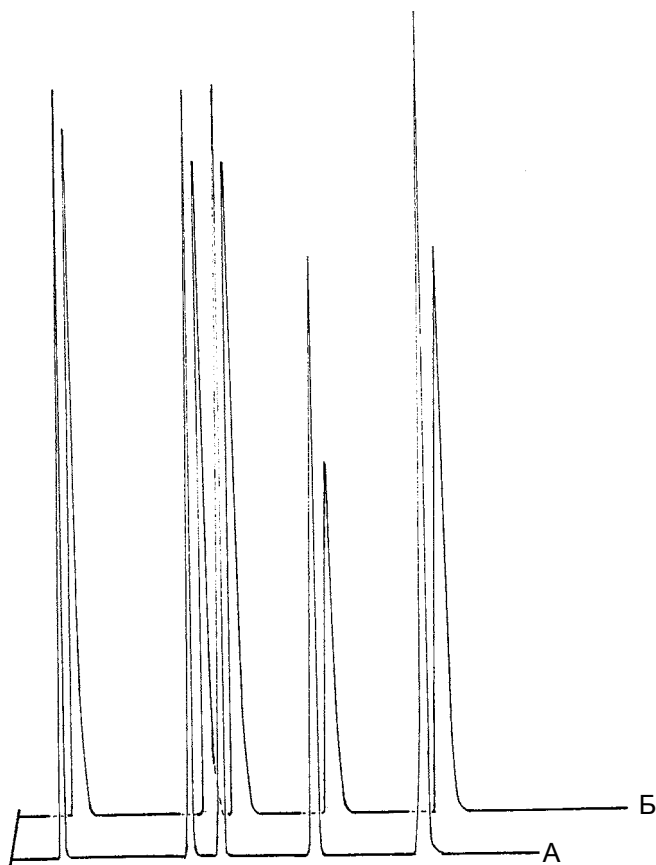


Рис. 2.10. Размытие хроматографических зон во внеколоночном объёме при одних и тех же стандарте и объёме пробы. Рис. (А) соответствует внутреннему диаметру соединительных трубопроводов 0,127 мм (0,005 дюйма), на рис. (Б) – 0,508 мм (0,02 дюйма) (времена удерживания существенно не изменились; хроматограмма (Б) сдвинута вправо для упрощения сравнения). Следует обратить внимание на то, что при диаметре трубопроводов 0,508 мм второй и третий пики почти не разрешены до нулевой линии.

2.3. Обзор приёмов разработки и оптимизации методик

Разработка методики разделения анализируемых веществ – наиболее трудоёмкая часть работы хроматографиста. Для упрощения этого процесса разработаны множество приёмов. Некоторые из них ограничиваются изменением существующих методик, сходных с разрабатываемой. Другие применяются, когда изначально ничего не известно о том, как добиться разделения. Далее рассмотрены наиболее распространённые из таких приёмов.

2.3.A. Элюотропные ряды и сила элюента

Параметры силы элюента* помогают хроматографисту быстро определить относительную силу элюентов. Первым делом были определены элюотропные ряды, каждому элюенту присвоено своё значение ϵ^0 [5]. Значение ϵ^0 было рассчитано по среднему времени удерживания, полученному для большого количества растворяемых веществ на конкретном сорбенте.

В таблице 5 в Приложении приведены значения ϵ^0 для большого количества элюентов на ряде материалов неподвижной фазы. В общем виде зависимость времени удерживания от ϵ^0 таково, что чем больше ϵ^0 , тем меньше время удерживания данного анализируемого вещества. В терминах хроматографии при сравнении характеристик элюирования двух элюентов говорят, что элюент, применение которого приводит к возрастанию времени удерживания веществ, является более слабым, а тот, который даёт меньшее время удерживания, – более сильным. В частности, если неподвижная фаза представляет собой силикагель, гексан, имеющий малое значение ϵ^0 , является очень слабым элюентом, а метанол, у которого ϵ^0 велико, – очень сильным. Более конкретно, увеличение ϵ^0 на 0,05 (т.е. переход на более сильный элюент) приводит к уменьшению k' в 2 – 4 раза. Напротив, уменьшение ϵ^0 на 0,05 (т.е. переход на более слабый элюент) приводит к увеличению k' в 2 – 4 раза.

Удобнее всего пользоваться ϵ^0 для прогнозирования примерного состава подвижной фазы, при котором можно получить приемлемые времена удерживания. Следует отметить, что значения ϵ^0 основаны на процессах адсорбции, соответственно, наибольшая эффективность приходится на участок разделения между жидкой и твёрдой фазами.

* В качестве элюента может быть использован и чистый растворитель. (прим. редактора)

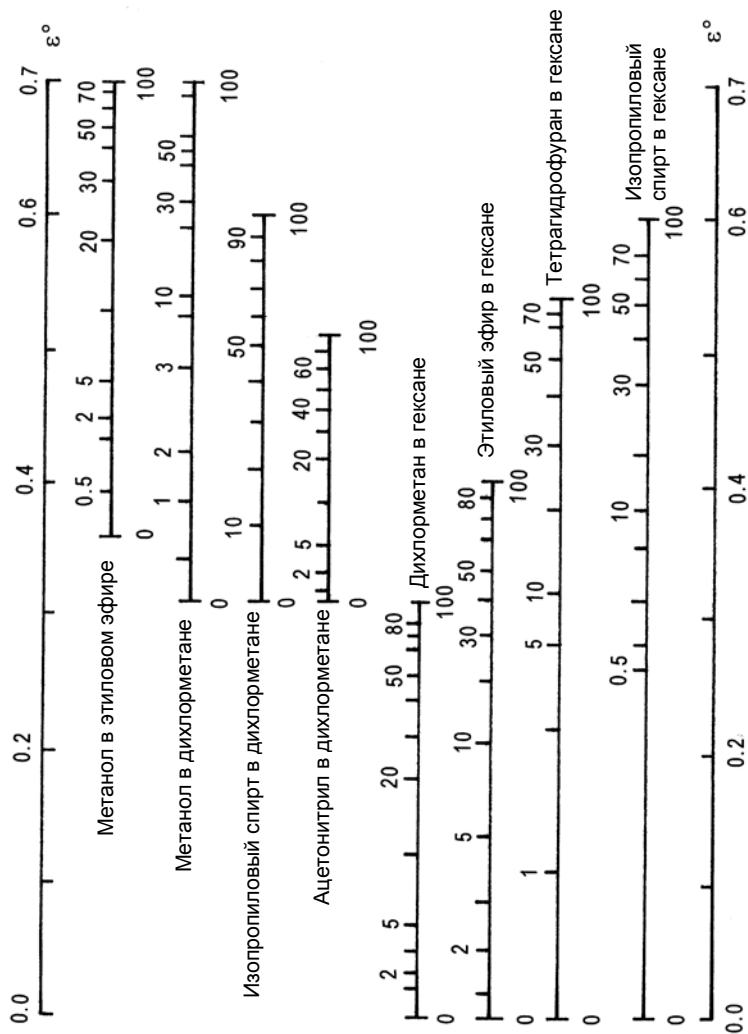


Рис. 2.11. Номограмма для определения составов подвижной фазы с примерно равной вязкостью. Порядок применения: соединить прямой линией точки на верхней и нижней шкалах с требуемыми значениями ϵ° . В точке пересечения этой прямой со шкалой соответствующей смеси растворителей определить соотношение компонентов этой смеси.

Время удерживания в терминах коэффициента ёмкости k' [$k' \equiv (t_r - t_0)/t_0$, где t_r – время удерживания анализируемого вещества, t_0 – время удерживания несорбируемого компонента] проявляет выраженную логарифмическую зависимость от состава элюента. Значение ϵ^0 для подвижной фазы смешанного состава зависит также от параметров колонки и разделяемых веществ. Уравнения для прогнозирования примерного состава двухкомпонентной подвижной фазы сложны, а использование их трудоёмко. Для упрощения работы хроматографиста построены многочисленные номограммы (см., например, рис. 2.11). Для пересчёта к значениям ϵ^0 для оксида алюминия можно воспользоваться приближённой формулой $1,3 \epsilon^0(\text{SiO}_2) \approx \epsilon^0(\text{Al}_2\text{O}_3)$ [5]. Чтобы воспользоваться рис. 2.11, соедините прямой линией равные значения ϵ^0 на верхней и нижней шкалах. В точке пересечения этой прямой со шкалой состава двухкомпонентного элюента будут указаны доли каждого компонента. Если прямые не пересеклись, данная пара компонентов непригодна для требуемого разделения. Например, двухкомпонентные элюенты со значением ϵ^0 0,55 могут представлять собой смеси изопропилового спирта с гексаном в отношении 55:45, изопропилового спирта с дихлорметаном в соотношении 72:28, метанола с этиловым эфиром в соотношении 14:86.

При пользовании номограммой следует учитывать два момента. Во-первых, не все силикагели идентичны, так что шкалы ϵ^0 являются приближёнными. Во-вторых, самого по себе показателя ϵ^0 недостаточно, чтобы сделать вывод о преимуществе одной пары элюентов по отношению к другой, так как он определяется взаимодействием функциональных групп растворителей в элюенте и анализируемого вещества. Назначение номограмм, скорее, в том, чтобы подсказать, какой состав элюента можно принять за отправную точку при разработке или уточнении методики.

Ещё один параметр, на основе которого можно прогнозировать времена удерживания, – это полярность P' . Значения P' для большого числа элюентов также приведены в таблице 5. В отличие от ϵ^0 , значения P' определяются по параметрам равновесного распределения, то есть не относятся к разделению, при котором главным процессом является адсорбция. Параметр P' целесообразно применять в распределительной хроматографии, например, когда используются обращённые фазы (октадецил, октил, фенил и т.п.).

В общем виде соотношение значений k' для заданного анализируемого вещества и двух разных подвижных фаз, 1 и 2, можно описать следующим образом:

$$\log \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{P'_2 - P'_1}{2}.$$

В первом, довольно грубом, приближении можно считать, что для элюента из двух и более компонентов

$$P' = V_1 P_1 + V_2 P_2 + \dots + V_n P_n,$$

где V_n – объёмная доля n -го компонента P_n .

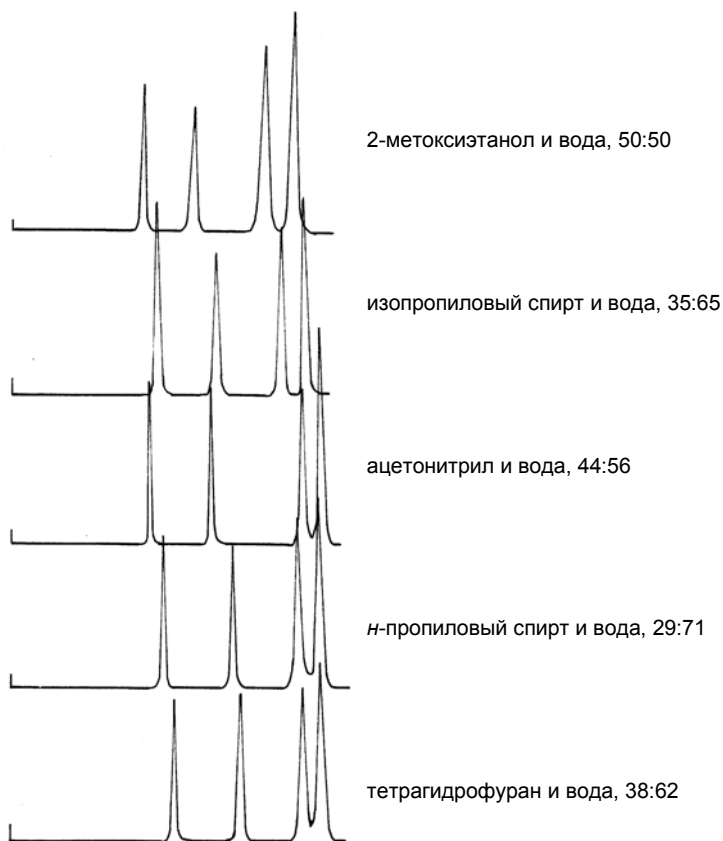


Рис. 2.12. Элюирование четырёх многоядерных ароматических углеводородов на сорбенте C_{18} с подвижными фазами указанных составов (в объёмных долях). Порядок выхода: бензол, нафталин, фенатрен, антрацен.

Применение этих формул даёт исходный состав подвижной фазы для разработки методики. К примеру, чтобы приготовить элюент со значением $P' = 6,9$, можно использовать смесь воды с ацетонитрилом в соотношении объёмных долей 25:75

$$P'_{H_2O} V_{H_2O} + P'_{ACN} V_{ACN} = 10,2 \times 0,25 + 5,8 \times 0,75 = 6,9$$

или смесь воды с изопропиловым спиртом в соотношении 48 : 52

$$P'_{H_2O} V_{H_2O} + P'_{IPA} V_{IPA} = 10,2 \times 0,48 + 3,9 \times 0,52 = 6,9).$$

Рис. 2.12 иллюстрирует пределы применимости описанного приближённого метода. Здесь через колонку с сорбентом C_{18} пропускали смесь четырёх ароматических углеводов. Подвижные фазы были составлены так, чтобы получить по возможности близкие хроматограммы. Расчёт значений P' даёт: 7,85 для смеси 2-метоксиэтанола и воды в соотношении объёмных долей 50:50; 8,00 – для смеси изопропилового спирта и воды в соотношении 35:65; 8,26 – для смеси ацетонитрила и воды, 44:56; 8,40 – для смеси *n*-пропилового спирта и воды, 29:71; 7,84 – для смеси тетрагидрофурана и воды, 38:62. Диапазон значений P' – от 7,84 до 8,40 показывает, что использование данного параметра даёт весьма приближённые условия.

2.3.Б. Треугольные диаграммы элюентов

Для разделений с обращённо-фазными сорбентами используют треугольные диаграммы, в которых в вершинах треугольника расположены вода,

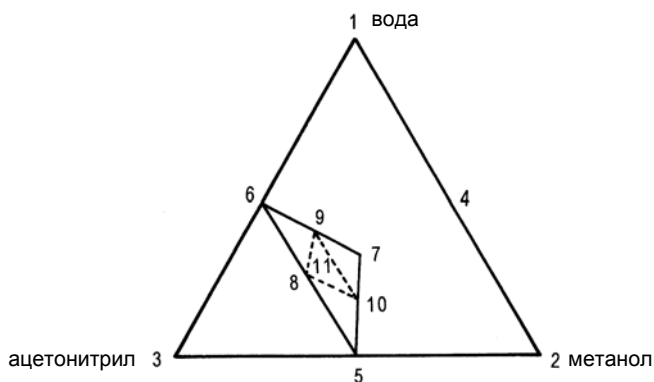


Рис. 2.13. Треугольная диаграмма элюентов для оптимизации условий разделения (описание см. по тексту)

ацетонитрил или тетрагидрофуран и метанол или изопропиловый спирт [7]. Для оптимизации используют результаты, соответствующие точкам от 1 до 7 (рис. 2.13). Три лучших для разделения соотношения, например, точки 5, 6 и 7, становятся вершинами нового треугольника, затем находят ещё четыре результата для точек 8, 9, 10 и 11 (здесь точка 8, например, соответствует соотношению ацетонитрила метанола и воды 42,5:42,5:16,5). Аналогичным образом оптимизируют составы смесей любых трёх элюентов, которые вообще способны смешиваться друг с другом. Если в вершинах первоначального треугольника расположить не чистые растворители, а смеси, количество итераций до окончательной оптимизации можно уменьшить. Например, использование 100 % ацетонитрила, 100 % воды или 100 % метанола редко даёт хорошее разделение, поэтому в одной из вершин можно расположить смесь с соотношением ацетонитрила, метанола и воды 80:10:10 и так далее. Разумеется, полезно что-то знать заранее о требуемом хроматографическом разделении. Для ускорения оптимизации можно использовать компьютерные алгоритмы, для расчёта четырёхкомпонентных смесей элюентов применять диаграмму в виде тетраэдра. Во всех случаях эти приёмы позволяют найти соотношение компонентов смеси элюентов, дающее в изократическом режиме оптимальное разделение всех пиков. Поскольку метод оптимизации ничего не говорит о ёмкости колонки (т.е. наибольшем количестве пиков, которые могут быть разделены на минимально приемлемом уровне в заданное время), приемлемость разрешения до нулевой линии не гарантируется. Соответственно, приемлемое с точки зрения хроматографа разделение может оказаться возможным только в градиентном режиме.

2.3.В. Оконные диаграммы

Для слабых органических кислот Деминг предложил использовать *оконные диаграммы* [8]. Для каждой пары элюентов строится зависимость соотношения времён удерживания от водородного показателя элюента pH. На рис. 2.14 показана оконная диаграмма для четырёх анализируемых веществ. Обратите внимание на то, что построены шесть зависимостей разрешения от pH для шести сочетаний анализируемых веществ. Линия, пересекающая ось R_s в самой высокой точке, показывает, при каком pH достигается оптимальное разрешение. Окна под кривыми дают локальные оптимумы разрешения для всех пар анализируемых веществ. Данный способ оптимизации особенно хорош для систем с множеством анализируемых веществ, поскольку для построения графиков используются результаты, полученные в опыте.

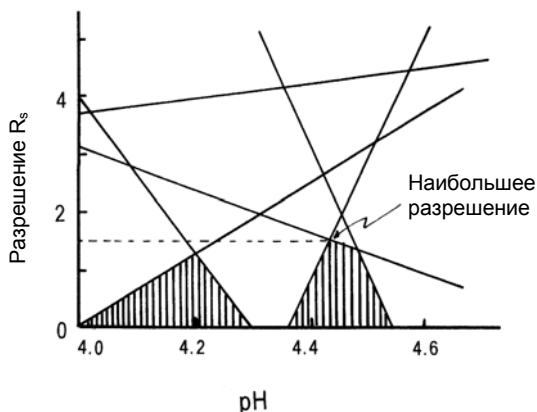


Рис. 2.14. Оконная диаграмма для четырёх анализируемых веществ при разных значениях pH. Наибольшее разрешение составляет около 1,5 при pH = 4,2.

Для окончательной оптимизации условий хроматографического опыта нужно также принимать во внимание разумные пределы времен удерживания и других параметров.

2.3.Г. Пробные градиенты

Описанные выше приёмы основаны на системном подходе к разработке методики разделения. При этом в предположении изократического режима изменяют одну переменную (или несколько взаимосвязанных переменных) и исследуют результаты. Такие приёмы весьма эффективны, если известно, из каких веществ состоит проба и понятно, какие параметры разделения наиболее важны.

В случаях, когда неизвестно даже количество переменных, применять изократический подход рискованно. Во-первых, трудно сказать, будут ли элюированы все пики. Некоторые вещества удерживаются столь сильно, что соответствующие пики сливаются с нулевой линией (если изократические условия предпочтительны, следует начинать с самого сильного элюента. В этом случае можно найти время удерживания последнего пика. Затем можно уменьшать силу подвижной фазы, насколько это позволяет расчёт по треугольной диаграмме).

Если предполагается градиентный режим, можно провести опыт с максимальным градиентом от 0 до 100 и получить хроматограмму. Из неё можно оценить силу элюента, необходимую для элюирования каждого из компо-

нентов анализируемой смеси, а затем сделать попытку работать с меньшим градиентом или даже в изократическом режиме.

2.4. Линейность, чувствительность, предел обнаружения, отношение сигнал-шум и пригодность системы

Большинство методик количественного анализа предполагает построение калибровочной кривой по набору стандартов с известными концентра-

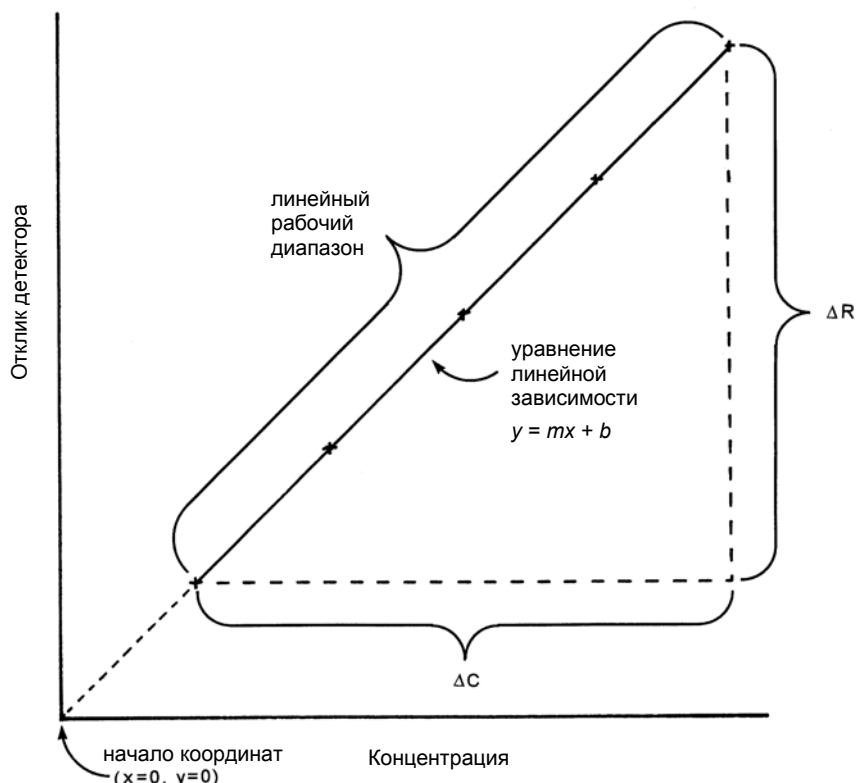


Рис. 2.15. График зависимости отклика детектора от концентрации. Стандарты с самой высокой и самой низкой концентрациями анализируемого вещества (отмечены «+») определяют линейный рабочий диапазон. Линейная зависимость описывается уравнением $y = mx + b$, где y – отклик для данной концентрации x , m – коэффициент наклона (соответствует чувствительности и коэффициенту отклика R), b – точка пересечения с осью y . Если калибровочная кривая проходит через начало координат, $b = 0$.

циями анализируемых веществ. В самом общем виде *калибровочная кривая* – это график зависимости отклика детектора R от концентрации анализируемого вещества в растворе стандартного образца. Такой график показан на рис. 2.15. Наименьшая и наибольшая концентрация, при которых могут быть получены статистически приемлемые результаты анализа, определяют *рабочий диапазон концентраций*. В идеале калибровочная кривая обладает следующими свойствами: (1) она линейна во всём диапазоне концентраций; (2) её продолжение проходит через начало координат (то есть нулевой концентрации соответствует нулевой отклик); (3) её наклон не слишком крут (так что рабочий диапазон концентраций не слишком узок), но и не слишком полог (так что отклик заметно меняется при изменении концентрации).

2.4.А. Линейность

Линейность калибровочной кривой показывает, насколько коррелирует набор точек в координатах отклик – концентрация в пределах рабочего диапазона. Точки с самой малой и самой большой концентрациями определяют рабочий диапазон методики. Калибровочная кривая описывается обычным уравнением линейной зависимости: $y = mx + b$, где y – отклик детектора, m – коэффициент наклона (соответствует чувствительности $\Delta R/\Delta C$), b – значение y , при котором $x = 0$, т.е. точка пересечения с осью y (см. рис. 2.15). Степень корреляции калибровочной кривой с линейной зависимостью описывают с помощью коэффициента корреляции r^2 . Для важных аналитических опытов значение r^2 должно быть не менее 0,995. Для менее важных случаев может быть приемлемым значение r^2 0,990 и даже меньше.

Иногда калибровочная кривая может оказаться существенно нелинейной. Обычно так бывает при работе со спектрофотометрическими детекторами в области очень больших и очень малых концентраций анализируемых веществ, когда имеет место отклонение от закона Бэра. Флуориметрические детекторы дают нелинейный отклик в области высоких концентраций вследствие так называемого самопоглощения: молекулы анализируемого вещества между флуоресцирующей молекулой и приёмником детектора поглощают излучение, из-за этого регистрируется меньшая интенсивность флуоресцентного излучения.

Если калибровочная кривая является нелинейной, и добиться линейности подбором условия анализа не удаётся, используют нелинейную аппроксимацию. На рис. 2.16 показаны кусочно-линейное и криволинейное приближения зависимости отклика от концентрации полученные опытным путём.

Обычно системы обработки данных включают средства аппроксимации, однако нелишне понимать, как они действуют. Кусочно-линейная аппроксимация состоит в соединении соседних точек отрезками прямых. Концентрацию в аналитическом опыте находят по соответствующим значениям отклика на этих отрезках.

В более сложных случаях набор точек калибровочной кривой может лечь на график квадратного трёхчлена или многочлена более высокого порядка, иначе говоря, зависимость отклика от концентрации описывается более сложным, чем линейной, уравнением.

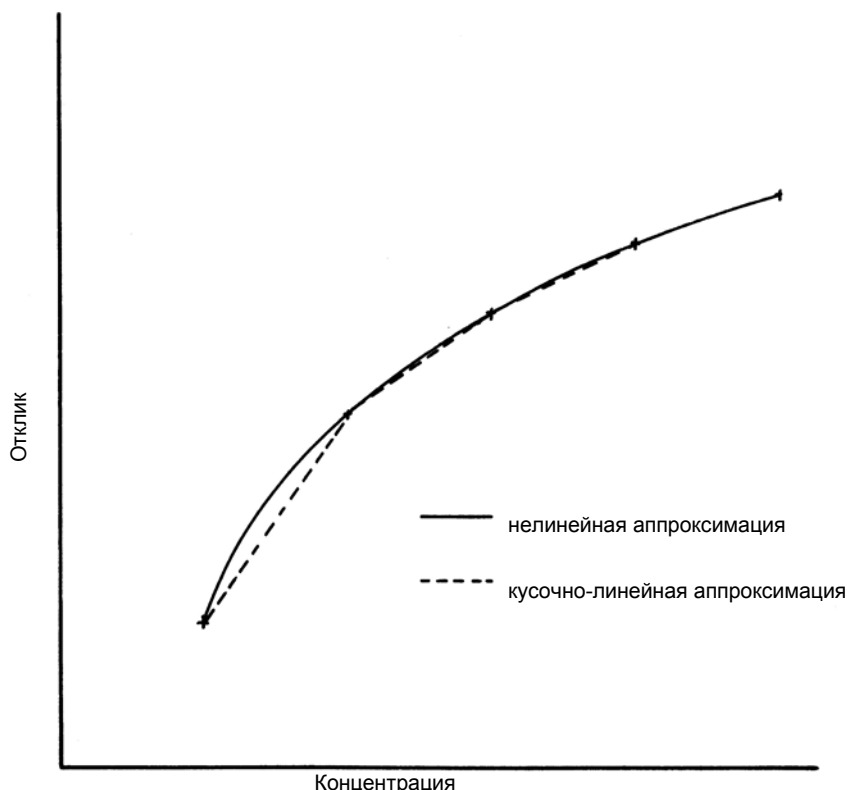


Рис. 2.16. Два способа аппроксимации нелинейных зависимостей: кусочно-линейная (штриховая линия) и нелинейная (сплошная линия). Кусочно-линейная аппроксимация выполняется быстро и не требует или почти не требует специализированного программного обеспечения. Чем больше кривизна (как на участке малых концентраций), тем больше отклоняется кусочно-линейная аппроксимация от фактических значений.

2.4.Б. Чувствительность

Чувствительность методики определяется как коэффициент наклона калибровочной кривой. Как показано на рис. 2.15, его значение равно $\Delta R/\Delta C$. Большей чувствительности соответствует более крутой наклон калибровочной кривой, иначе говоря, отклик меняется сильнее при том же изменении концентрации. При меньшей чувствительности наклон калибровочной кривой меньше. Поскольку предел значений отклика детектора данного типа изменить нельзя, рабочий диапазон обратно пропорционален чувствительности методики. *Не следует путать чувствительность с пределом обнаружения методики.*

Почему чувствительности анализа придаётся такое большое значение? Если чувствительность излишне высока, диапазон концентраций, в котором можно вести анализ, будет очень узким. Чтобы попасть в этот диапазон, нужно очень тщательно готовить и разводить пробы. Если же чувствительность излишне низка, методика не позволит распознать близкие концентрации анализируемых веществ (рис. 2.17). Чувствительность должна быть на среднем уровне, чтобы обеспечить как возможно более широкий рабочий диапазон, так и хорошее определение близких значений концентрации.

2.4.В. Предел обнаружения

Предел обнаружения зависит от условий анализа и природы определяемых веществ и подчас кажется окутанным тайной. Дело в том, что для определения предела обнаружения нужно найти множество параметров. По определению, предел обнаружения – это точка, в которой сигнал от анализируемого вещества становится неотличимым от шума в системе. Однако с практической точки зрения можно рассматривать это понятие двояко. С одной стороны, предел обнаружения определяется методикой, с другой – приборной частью хроматографической установки. Прежде, чем перейти к дальнейшему обсуждению, следует ввести ещё один параметр, влияющий на предел обнаружения, а именно, отношение сигнал-шум.

2.4.Г. Отношение сигнал-шум

Отношение сигнал шум связано с определением отклика как того, во сколько раз сигнал от анализируемого вещества должен превосходить по уровню шум, чтобы считаться истинным сигналом. Рис. 2.18 представляет в увеличенном виде нулевую линию и иллюстрирует понятие уровня шума. При изократических условиях шум системы обычно определяют, записывая

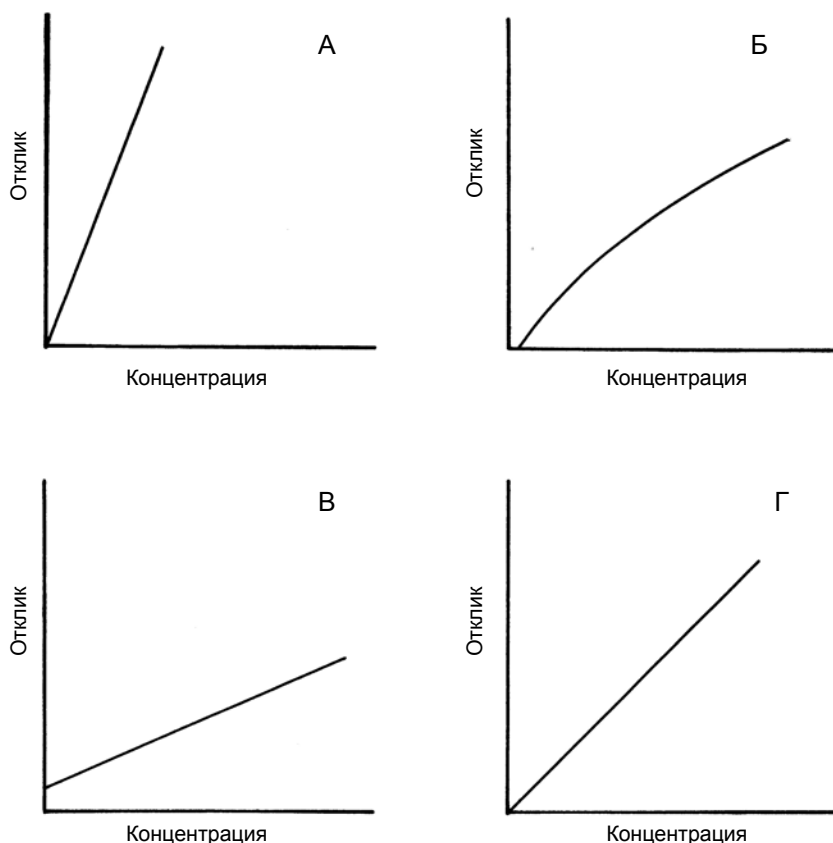


Рис. 2.17. Типичные калибровочные кривые. (А) Слишком высокая чувствительность (значение $\Delta R/\Delta C$ слишком велико) – рабочий диапазон слишком мал. (Б) Нелинейная, пересечение с осью y не в нуле (можно использовать нелинейную аппроксимацию, но нужны специальные программы). (В) Слишком низкая чувствительность (значение $\Delta R/\Delta C$ слишком мало), пересечение с осью y не в нуле. (Г) Идеальная калибровочная кривая: хорошая чувствительность, пересечение с осью y почти в нуле.

сигнал в холостом опыте в течение 1 – 2 часов. Наибольший размах сигнала в этом промежутке времени и считается шумом системы.

В градиентном опыте шум определяют аналогично, однако опыт должен иметь довольно большую продолжительность, при этом нужно следить за

постоянством уровня шума. Скачкообразное изменение отклика из-за изменения состава подвижной фазы шумом не считается.

Теперь можно определить предел обнаружения. Если выбрать наименьшее отношение сигнал-шум равным 5:1 (записывается $S/N = 5$), то сигнал, уровень которого меньше, не принимается в расчёт. Чем выше отношение сигнал-шум, тем выше точность и сходимость анализа. Принять меньшее отношение сигнал-шум означает поступиться точностью и сходимостью ради возможности обнаруживать как можно меньшие концентрации анализируемых веществ. Выбор определяется задачами, стоящими перед аналитиком.

Теперь можно выяснить, какая разница между двумя вышеупомянутыми типами предела обнаружения. *Приборный* предел обнаружения (иначе просто «предел обнаружения», обозначается LOD) рассчитывается при низком отношении сигнал-шум. Здесь всё, что необходимо, – отличить наличие определяемого вещества от его отсутствия. Обратите внимание, что при $S/N = 2$ пик любого анализируемого вещества может на 50 % состоять из шума. Невзирая на это, именно предел обнаружения обычно рекламируют продавцы аппаратуры. Поэтому нужно обязательно узнать,

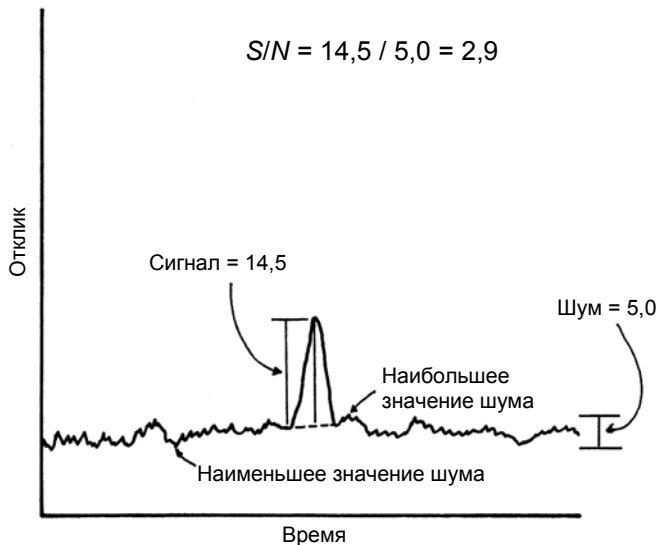


Рис. 2.18. Расчёт отношения сигнал/шум. Обычно это делают в разных экспериментах: сначала длительно вхолостую регистрируют нулевую линию, затем проводят опыт с введением пробы. На рисунке для упрощения показаны как пик анализируемого вещества, так и размах шума (от наименьшего до наибольшего значения).

какое отношение сигнал-шум выбрал изготовитель, какие вещества и при каких условиях опыта он анализировал, чтобы точно оценить достоинства и недостатки аппаратуры.

Предел обнаружения *методики* (также называемый «предел количественного определения», обозначается *LOQ*) выбирают такое отношение сигнал-шум, чтобы не просто различить наличие и отсутствие определяемого вещества, а получить осмысленный и повторяемый количественный результат. Соответственно, предел обнаружения методики, как правило, определяют при отношениях сигнал-шум от 5 до 10. Итак, *LOD* и *LOQ* обычно существенно различны.

2.4.Д. Коэффициент отклика

Коэффициент отклика используется в методиках как с внешним, так и с внутренним стандартом. В методике с *внешним стандартом* калибровочную кривую строят с помощью образцов, диапазон концентраций анализируемого вещества в которых перекрывает предполагаемый интересующий диапазон. Обычно кривую строят по пяти точкам. После валидации методики можно уменьшить количество точек от внешнего стандарта и определять коэффициент отклика R_f по наклону кривой или даже по одной точке (обычно средней, соответствующей предполагаемой концентрации анализируемого вещества). В обоих случаях – при определении коэффициента отклика как по наклону, так и по точке, R_f выражается в единицах отношения отклика к концентрации, т.е. (единица поглощения)/(М/л). Если калибровочная кривая линейна, R_f – её коэффициент наклона. Отклик детектора при выходе анализируемого вещества, делённый на коэффициент отклика, даёт концентрацию этого вещества в пробе (без учёта массы пробы, коэффициента разведения и пр.).

Если используется *внутренний стандарт*, до начала анализа в пробу вводят известное количество соединения, химически подобного определяемому веществу, но разделенного с ним хроматографически и не являющегося частью матрицы пробы. При этом предполагается, что благодаря химическому подобию внутреннего стандарта определяемому веществу они будут вести себя в процессе анализа сходным образом. Внутренний стандарт используется для контроля потерь анализируемого вещества при преданалитической обработке пробы и компенсации небольших отклонений в работе хроматографа. Впрочем, последнее не столь важно, как это было ранее, поскольку в последнее время метрологические характеристики аппаратуры значительно повысились. Тем не менее, внутренние стандарты и суррогаты (т.е. вещества, отличные от анализируемых, вводимые в пробу

до анализа) по-прежнему играют важную роль, если имеет место значительная обработка пробы до ввода в хроматограф. Дело в том, что иначе проконтролировать потери анализируемых веществ в процессе пробоподготовки становится невозможно.

При использовании внутренних стандартов необходимо убедиться в линейности отклика детектора на внутренний стандарт. Коэффициент отклика рассчитывают по отношению площади пика анализируемого вещества (A_u) к площади пика внутреннего стандарта (A_{is}) и концентрации внутреннего стандарта (C_{is}) в калибровочной пробе:

$$R_f = \frac{A_u / A_{is}}{C_{is}}.$$

Затем находят концентрацию определяемого вещества в пробе как отношение площади пика этого вещества A_u к площади пика внутреннего стандарта A_{is} и коэффициенту отклика R_f :

$$C_u = \frac{A_u / A_{is}}{R_f}.$$

2.4.Е. Разработка методики

Методику разрабатывают не на пустом месте. В ходе разработки учитывают множество соображений. Некоторые из них – практического толка, как, например, использование имеющейся аппаратуры, применение наименее опасных и вредных химических реактивов и процессов, ограничение потребления расходных материалов. Другие – это соображения, связанные с физической и химической природой пробы и анализируемых веществ. Сюда относятся состояние матрицы пробы, содержащей определяемое вещество (твёрдое, жидкое, газообразное), структура, устойчивость и химическая активность этого вещества. Важно также учитывать его количество и то свойство, по которому производится детектирование (поглощение излучения, заряд, флуоресценция, показатель преломления). Необходимо продумать вопросы, связанные с растворимостью аналита, а также чувствительность к изменению pH, температуры, содержания кислорода и световому излучению.

Продумав всё это, надлежит перейти к функциональным вопросам, к примеру, точности и правильности методики, уровня сложности манипуляций с пробой, времени, необходимого для пробоподготовки и анализа (иначе говоря, производительности хроматографа), простоты переноса

методики на другие приборы, освоения её другими хроматографистами и и другими лабораториями.

Указанные соображения определяют некий набор основных требований. Экспериментатор варьирует рабочие параметры (состав подвижной фазы, растворитель пробы, размеры колонки и состав набивки), пока не будут удовлетворены все критерии. Этот процесс, называемый *оптимизацией*, продолжается до тех пор, пока все требования не будут выполнены. После этого считается, что все переменные однозначно определены, разработка новой методики закончена.

2.4.Ж. Валидация и документирование методики

Методика описывается в документе, содержащем все существенные её элементы. Цель этого документа в том, чтобы дать возможность специалисту воспроизвести методику и получить результаты, не отличающиеся статистически от результатов, которые любой другой аналитик может получить, используя ту же методику.

Итак, документ, описывающий методику, содержит:

1. Обобщённое описание пробоподготовки (разведение, экстрагирование, смена растворителя и т.д.).
2. Общие требования к хроматографической системе (тип колонки, примерный состав подвижной фазы, тип и установки детектора, использование внешних или внутренних стандартов и т.д.).
3. Перечень ошибок, которых следует избегать.

Обратите внимание на то, что данный документ *не содержит* подробного описания методики. Подробности уточняются в каждой лаборатории независимо. По существу, описание методики даёт лаборатории основу для разработки документа, описывающего во всех деталях, как именно в этой лаборатории проводится анализ.

Исходя из общего описания анализа, весь его процесс описывают, уточняют и оптимизируют. Разрабатывают предварительную методику, на основании которой несколько аналитиков или лабораторий проводят анализ. Процесс, позволяющий убедиться в том, что во всех лабораториях все аналитики воспроизводят одни и те же результаты, используя данную методику, называется *валидацией методики*. Методика не может считаться прошедшей валидацию, пока ряд аналитиков в ряде лабораторий не проанализируют *один и тот же набор* проб, используя протокол, описанный в методике, и не получают статистически эквивалентные результаты [9]. Статистическая обработка результатов помогает выработать минимально

необходимые критерии, касающиеся точности и сходимости анализа. Если эти критерии удовлетворяются, порядок работы подробно описывают в виде документа, который называется «*Стандартная Операционная Процедура*» (СОП).

2.4.И. Документация по описанию стандартной операционной процедуры (СОП)

В документации по СОП описывается во всех подробностях, как в точности в лаборатории работают с каждой отдельной пробой. Уровень детализации описания – самый высокий. Приводятся все количественные показатели – объёмы мерных колб, коэффициенты разведения, объёмы вводимых в хроматограф проб. Описываются все использованные при анализа компоненты – тип колонки, качество растворителя, типы фильтров, стандарты, требования к их чистоте. Протоколируются все условия работы – расход, установки детектора, температура установки. По существу, данный документ детализирован настолько, что на его основе квалифицированный хроматографист может в точности воспроизвести опыт, а ревизор – проследить за пробоподготовкой и анализом. Никакие отклонения от СОП не допускаются.

2.4.К. Пригодность хроматографической системы

Помимо подробного описания порядка применения методики, нужно каким-то образом гарантировать, что аппаратура работает в допустимых пределах рабочих параметров. Указанные параметры, на основании которых делается вывод о пригодности или непригодности анализа, разделяются на два класса: касающиеся отдельных пиков и касающиеся соотношений между пиками. Для отдельных пиков такими параметрами являются коэффициент асимметрии, число теоретических тарелок, площадь или высота пика, а также относительное стандартное отклонение для повторных вводов пробы. Для нескольких пиков используют разрешение (R_s или α). Значения указанных параметров определяют в каждом опыте в процессе валидации методики, а впоследствии постоянно контролируют и протоколируют.

Площадь и асимметрия пиков могут быть ограничены сверху и снизу, а число теоретических тарелок и разрешение – только снизу. Когда сформулированы требования к параметрам, их значения должны периодически контролироваться. Для этого можно, например, наносить их на графики, как описано в разделе 3.12. Значения, выходящие за предельно

допустимые, свидетельствуют о неисправности или ошибке в работе. Преимуществом графического отображения является возможность заблаговременно заметить тенденцию в изменении того или иного параметра аппаратуры, поскольку именно тенденция зачастую говорит о том, что вскоре произойдёт нарушение работы.

Количество контролируемых параметров и ширина диапазона их допустимых значений зачастую связано с тем, насколько велика ответственность за результаты анализа этого вещества. Например, при анализе бытовых чистящих средств допустим куда больший разброс рабочих параметров, чем при анализе сильнодействующих веществ в лекарственных препаратах. Если все критерии удовлетворяются, и хроматограф работает надлежащим образом, данные, полученные при анализе образца, будут обладать высокой достоверностью. Если же параметры прибора выходят за допустимые пределы, вступают в силу положения Главы 3.

Прежде, чем отчитываться о результатах анализа, необходимо убедиться в том, что допустимые пределы изменения всех параметров документированы, и в процессе работы действительные параметры системы не выходят за эти пределы. Если все параметры в процессе анализа находятся в заданных пределах, это говорит о том, что установка пребывает в *управляемом состоянии*, а полученные на ней результаты высоконадёжны. Если же параметры хроматографической системы не отвечают требованиям пригодности, то есть одна или несколько переменных выпадают за допустимые пределы, систему следует считать *неуправляемой*. В этом случае необходимо найти и устранить неисправность или ошибку в работе оператора.

2.4.Л. Устойчивость и выносливость методики

Как сказано выше, идеальную методику отличает полное отсутствие или незначительность разброса результатов независимо от типа аппаратуры, квалификации оператора (если его квалификация отвечает минимальным требованиям), а также небольших различий в параметрах системы и матрицы пробы от лаборатории к лаборатории. Методика обладает *выносливостью* (*ruggedness of the method*), если она даёт воспроизводимые результаты (в терминах относительного стандартного отклонения, *RSD*, в процентах). Это означает, что на методика нечувствительна к смене реактивов, операторов и аппаратуры. Зачастую выносливость является необходимым условием валидации методики, поскольку при разработке важнейших методик фирмы проводят межлабораторные валидационные испытания.

В более широких масштабах объединения фирм-изготовителей, желающие пользоваться одними и теми же приёмами анализа, также проводят совместные круговые исследования.

Под *устойчивостью* или *робастностью* (*robustness*) понимают свойство методики давать приемлемые результаты при умышленном изменении её параметров. К таким параметрам относятся состав подвижной фазы, pH раствора и температура. Устойчивость методики обычно изучают только на начальных этапах процесса валидации. При этом выясняют, какие из параметров наиболее важны, и что следует предпринять, чтобы не допустить их изменения.

2.5. Обзор вариантов хроматографического разделения

Количество вариантов реализации высокоэффективной жидкостной хроматографии выросло столь значительно, что их уже целесообразно разделить на несколько категорий. В большинстве случаев для разделения используются фундаментальные физические и химические различия классов соединений. К таким различиям относятся заряд, конформация, размеры молекул, растворимость, устойчивость, трёхмерная структура. Сорбенты подвергают модификации, чтобы добиться наибольшего различия в силе удерживания, обусловленной физическими и химическими свойствами.

В данном разделе даны основные положения, относящиеся к разным типам разделения, описано, как и когда они используются, указаны классы разделяемых веществ. В таблице 2.2 дан перечень категорий, которые будут рассмотрены ниже в разделе.

2.5.А. Нормально-фазная хроматография

По определению, нормальными называются полярные неподвижные фазы или материалы набивки. Существуют три типа нормальных фаз: немодифицированные, модифицированные с нанесёнными веществами и привитые.

Немодифицированные сорбенты относятся к категории жидкостно-твёрдотельной хроматографии (ЖТХ). Классические нормальные фазы использовались в ЖХ изначально: это окись алюминия (Al_2O_3) и окись кремния (SiO_2). Для разделения используют существенно неполярные подвижные фазы (например, пентан, гексан, гептан, изооктан) с малыми добавками (как правило, от 0,1 до 10 %) более полярных веществ (эфиров, ацетатов,

Таблица 2.2
Классификация ЖХ по типам разделения

Наименование	Характер разделяемых веществ	Характер взаимодействия между анализируемыми веществами и поверхностью сорбента в колонке
Нормально-фазная (немодифицированная поверхность)	Низкополярные, изомеры	Адсорбция на основе диполь-дипольного взаимодействия и образования водородных связей
Нормально-фазная (привитофазные сорбенты)	Широкий диапазон молекулярных масс – от малых до средних; любая полярность	Распределение и адсорбция на основе диполь-дипольного взаимодействия и взаимодействия веществ с различной полярностью
Обращенно-фазная (привитофазные сорбенты)	Широкий диапазон молекулярных масс – от малых до средних; любая полярность	Распределение и адсорбция на основе гидрофобного взаимодействия
Ион-парная	Заряженные или высокополярные	Распределение и адсорбция на основе электростатического и гидрофобного взаимодействия между парами ионов
Ионнообменная	Имеющие постоянный заряд	Ионное равновесие на основе только плотности заряда
Аффинная	Подложка и ферменты	Распознавание молекул на основе специфических трёхмерных многоточечных процессов связывания, например, диполь-дипольного взаимодействия и образования водородных связей
Хиральная	Энантиоморфные соединения	Распределение и адсорбция на основе неспецифического трёхмерного взаимодействия, например, диполь-дипольного взаимодействия и образования водородных связей
Эксклюзионная	Олигомеры и полимеры	Разделение по размеру на основе различия размеров пор сорбента

хлорированных алканов, спиртов). В последнее время в качестве нормально-фазных адсорбентов стали применяться также графитированный углерод, окись циркония (ZrO_2) и гидроксилapatит [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$].

Удерживание на немодифицированной подложке обусловлено исключительно адсорбцией и десорбцией анализируемых веществ поверхностью сорбента. В этом процессе анализируемое вещество замещает компоненты подвижной фазы, адсорбированные поверхностью. Энергетика процесса и положительное взаимодействие анализируемого вещества с поверхностью и определяют его удерживание.

К модифицированным относятся, в первую очередь, материалы, в которых непосредственно на поверхность основы нанесены определенные органические или неорганические вещества. К примерам такого рода относятся ионы серебра (неорганический модификатор) и гликоли (органические модификаторы). Нанесённые материалы придают сорбенту иные свойства для взаимодействия с разделяемыми молекулами. Например, промышленность выпускает колонки с силикагелем, пропитанным соединениями серебра. Такие колонки используются для разделения соединений, различающихся по степени ненасыщенности. Механизмом удерживания и здесь остаётся адсорбция. Колонки с органическим модификатором существенно отличаются тем, что их готовят, как правило, в лаборатории. Здесь удерживание обеспечивается распределением анализируемых веществ между двумя жидкостями.

Нормально-фазные привитофазные сорбенты весьма разнообразны – от цианопропила до диола и многочисленных хиральных колонок. В таких колонках в качестве основы почти всегда используется силикагель, однако в последнее время промышленность освоила выпуск оксида алюминия и оксида циркония с полимерным покрытием. В привитофазных сорбентах удерживание обеспечивается адсорбционно-распределительным механизмом между подвижной фазой (содержащей анализируемое вещество) и привитой фазой. Селективность анализа определяется, в основном, свойствами неподвижной фазы, но правильный подбор элюента может значительно повысить селективность.

2.5.А.1. Немодифицированные нормально-фазные адсорбенты. Немодифицированные нормально-фазные адсорбенты эффективны при разделении изомеров и ингредиентов, экстрагированных из природных животных и растительных жиров. Весьма важно, что число веществ, растворимых в низкополярных подвижных фазах, ограничено, а сам процесс разделения крайне чувствителен даже к незначительным изменениям состава подвиж-

ной фазы. Именно эти два недостатка и сдерживают применение немодифицированных нормально-фазных сорбентов.

2.5.А.2. Оксид алюминия (Al_2O_3). С точки зрения хроматографии, оксид алюминия отличается от силикагеля (диоксида кремния) двумя важными показателями: устойчивостью к изменениям pH и возможностями химической модификации. Главное преимущество оксида алюминия по сравнению с силикагелем состоит в устойчивости в широком диапазоне pH. Устойчивость силикагеля резко падает в растворах с pH выше 7 или менее 2, тогда как оксид алюминия большей частью сохраняет устойчивость при pH от 0 до 14. Зная об этом, не следует, однако, забывать о проверке других компонентов системы для ВЭЖХ на совместимость с агрессивными подвижными фазами.

Главным недостатком оксида алюминия является то, что большинство вариантов модификаций его поверхности, желательных для хроматографии, полученных непосредственно химическим путём, являются нестабильными. Поэтому единственный путь модификации сорбентов на основе оксида алюминия – покрыть его поверхность реакционноспособными мономерами, а затем осуществить их сшивку и получить полимерный материал основы. Напротив, силикагель модифицировать химически можно очень легко и с хорошей воспроизводимостью, обеспечивая при этом стабильность полученного материала (например, с октадецилом).

Хотя оксид алюминия используется в хроматографии значительно реже, чем силикагель, он по-прежнему находит применение там, где в процессе разделения требуется очень высокий или очень низкий водородный показатель элюента. К тому же, в зависимости от способа подготовки, сам оксид алюминия может быть кислым, нейтральным или основным. Это определяется при измерении pH 10 %-ной водной суспензии оксида алюминия. Суспензии кислого оксида алюминия имеют pH около 3. Такие оксиды алюминия действуют как анионнообменные сорбенты. Суспензии основного оксида алюминия имеют pH около 9,5. Такие оксиды алюминия действуют как катионнообменные сорбенты. Суспензии нейтрального оксида алюминия имеют pH около 6,5 и чаще всего используются в ВЭЖХ.

Ещё одно ограничение на применение сорбентов на основе оксида алюминия налагает то, что диапазон диаметров пор весьма ограничен – чаще всего от 60 до 100 Å. Следовательно, в отличие от силикагелевых сорбентов, широкий диапазон площадей поверхности для сорбентов на основе оксида алюминия недоступен.

2.5.А.3. Силикагель (SiO_2). Силикагель применяется в ВЭЖХ в качестве сорбента чаще всего. Однако его использование в немодифицированном

виде пренебрежимо мало, по сравнению с применением в разнообразных производных формах. С точки зрения хроматографии, силикагелю присущи как достоинства, так и недостатки. К его преимуществам для ВЭЖХ относятся следующие:

1. Силикагель с диаметром зёрен от 1,5 мкм до 10 мкм можно получить легко и с высокой воспроизводимостью; такие силикагели выпускаются серийно.
2. Силикагель с диаметром пор от нуля (непористый) до 4000 Å также можно получить легко и с высокой воспроизводимостью; такие силикагели выпускает промышленность (диаметр пор радикально сказывается на удельной поверхности носителя – см. табл. 2.3).
3. Силикагель можно легко и с высокой воспроизводимостью модифицировать химически, получая материалы от высокополярных до неполярных и от неспецифических до высокоспецифических.
4. Большинство силикагелей класса «для ВЭЖХ» выдерживают рабочее давление до 27,6 МПа (4000 *фс/дюйм²*).
5. Силикагель устойчив к широкому спектру органических растворителей.

Таблица 2.3

Примерное соотношение размера пор и удельной поверхности силикагеля

Размер пор, Å	Удельная поверхность, м ² /г
30	> 650
60	500
100	250
120	200
300	100
500	50
1000	20
3000	10
4000	5

К недостаткам относятся следующие свойства силикагеля:

1. Силикагель даже после химической модификации имеет на поверхности участки (силанольные группы), сильно взаимодействующие с молекулами, способными образовывать водородные связи

(например, первичными аминами), что приводит к искажению формы хроматографических пиков (удлинению срезов), а в некоторых случаях – к необратимой адсорбции.

2. Поверхностные силанольные группы неоднородны, что приводит к искажению формы пиков – удлинению срезов.
3. Силикагель растворяется в жидкостях с pH менее 2 и более 7.
4. Немодифицированный силикагель быстро деактивируется (теряет способность к сорбции), если в элюенте имеется вода.

Поскольку достоинства силикагеля значительно «перевешивают» его недостатки, примерно 75 % сорбентов для ВЭЖХ выполнены именно на силикагелевой основе.

2.5.А.3.А. Химия поверхности силикагеля. На поверхности силикагеля имеются шесть различных химических групп (рис. 2.19). Первая, имеющая *силоксановую связь*, Si–O–Si, определяет структуру внутреннего «скелета» силикагеля. Вторая, кремниевая группа с гидроксильным окончанием, наиболее распространена на поверхности. Она называется *силанольной*.

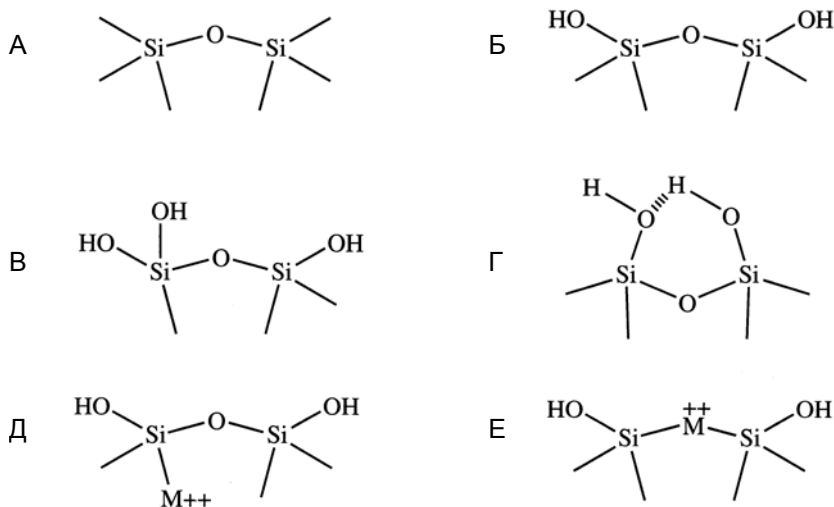


Рис. 2.19. Функциональные группы на поверхности силикагеля: (А) – силоксановая связь; (Б) – силанольная группа; (В) – геминальная силанольная группа; (Г) – вицинальная силанольные группы; (Д) – силанольная группа, модифицированная металлом; (Е) – включённый ион металла.

Силанольные группы следующего типа имеют две оконечные гидроксильные группы на одном атоме кремния и называются *парными или геминальными силанольными группами*. Далее, между двумя близлежащими силанольными группами может иметься водородная связь. В таком случае связанные силанольные группы называют *соседними или вицинальными*.

Дальнейшее рассмотрение осложняется тем, что матрица силикагеля не представляет собой чистый диоксид кремния, а содержит примеси в виде ионов металлов – двух- и трёхвалентного железа и трёхвалентного хрома. Если ионы металла расположены поблизости от поверхностных силанольных групп, они резко меняют кислотно-основный характер этих групп. В этом случае говоря о *силанольных группах, модифицированных металлом*. Наконец, шестая группа отличается тем, что ионы металла включены в поверхностную структуру силикагеля. Такие ионы могут взаимодействовать непосредственно с веществами, содержащимися в подвижной фазе.

Чтобы свести к минимуму неоднородность поверхности, в процессе производства силикагеля принимают ряд мер к удалению металлов и превращению вицинальных и геминальных силанольных групп в независимые. Для этого используют сверхвысокочистые коллоидные растворы оксида кремния, кислотное экстрагирование геля, удаление из геля адсорбированной влаги и преобразование вицинальных и геминальных силанольных групп на поверхности геля в независимые посредством термообработки. В результате удаётся получить более однородную поверхность сорбента, благодаря чему в хроматографическом опыте достигается значительное улучшение формы пиков.

После такой предварительной обработки получают материалы классов «с деактивированной основой» и «высокой чистоты». Особое внимание при работе с колонками, заполненными такими сорбентами обращают внимание на форму пиков при разделении основных соединений, содержащих аминогруппы. Это чрезвычайно важно для испытаний активных веществ в фармацевтических препаратах, поскольку они зачастую содержат одну или несколько амино-функциональных групп.

Преимущество силикагеля как нормально-фазного сорбента заключается в высокой эффективности разделения близких по строению веществ, таких как изомеров положения (например, *о*-, *м*-, *п*-крезол), геометрических изомеров (например, *цис-транс*-изомеров), а также веществ с различной степенью ненасыщенности (например, афлатоксинов B₁, B₂, G₁ и G₂).

При использовании немодифицированного силикагеля довольно трудно организовать опыт в градиентном режиме, поскольку время повторного уравнивания оказывается зачастую слишком большим. Кроме того,

следует избегать подвижных фаз, содержащих воду, поскольку при адсорбции воды силикагель быстро утрачивает активность, соответственно, резко ухудшается удерживание анализируемых веществ. Силикагель при этом называют *деактивированным*. Для повторного активирования силикагель промывают 2,2-диметоксипропаном*. Впрочем, Фармакопея США предписывает для преодоления трудностей, связанных с различной степенью деактивации силикагеля смешивать в известной пропорции растворитель с нулевым влагосодержанием и влагонасыщенный растворитель (например, *n*-бутилхлорид), получая таким образом элюент с воспроизводимым уровнем влагосодержания.

Если в подвижной фазе содержится вода, обычно лучше использовать нормально-фазный сорбент с привитой фазой, поскольку его выгодно отличают от немодифицированного силикагеля более короткое время уравнивания и более высокие устойчивость и долговечность.

2.5.А.4. Модифицированные нормально-фазные адсорбенты. Подложку из силикагеля модифицируют органическими или неорганическими добавками. В частности, серийно производится силикагель, пропитанный (импрегнированный) соединениями серебра. При использовании этого сорбента удаётся эффективно разделить ненасыщенные вещества, благодаря взаимодействию ионов серебра с π -электронами. Для предотвращения десорбции серебра из подложки подвижные фазы в этом случае состоят в основном из неполярных растворителей (не менее 99 % алкана) с небольшой добавкой слабо полярного вещества (до 0,25 % ацетонитрила). Аналогичным образом работают с другими подложками, модифицированными металлом.

При использовании органических модификаторов разделение основано на процессе распределения между двумя жидкими фазами (в отличие от адсорбции, то есть распределения между жидкой и твёрдой фазами), которое имеет место при покрытии поверхности силикагеля в разной степени органическими материалами. Для получения таких модифицированных материалов приготавливают раствор модификатора в высокой концентрации в соответствующем растворителе, затем раствор прокачивают через заранее набитую колонку. При этом состав раствора на выходе колонки постоянно контролируют до стабилизации его концентрации, которая свидетельствует о достижении равновесия между органическим модификатором и подложкой. Количество подвижной фазы с покрытием по достижении истинно равновесного состояния определяется исходным количеством

* Или любым другим, не содержащим влаги растворителем (прим. редактора).

модификатора в растворителе, составом растворителя и температурой. По окончании нанесения покрытия колонку промывают подвижной фазой, которая впоследствии будет применяться в хроматографических опытах.

Основное преимущество такого подхода состоит в возможности получить набивку колонки с характеристиками, точно соответствующими потребностям разделения. Имеется множество модификаторов, что даёт большую свободу манёвра. Кроме того, количество модификатора легко регулировать, изменяя его концентрацию в растворителе в процессе нанесения покрытия. При более высоком содержании модификатора на подложку будет нанесён более толстый слой неподвижной фазы, и сорбент будет иметь более высокую силу удерживания. Но при более толстом слое подвижной фазы будет иметь место размытие хроматографических зон из-за эффектов массопереноса. При оптимальной толщине можно достичь удовлетворительного удерживания, но при этом избежать значительного размытия пиков из-за массопереноса.

Впрочем, распределительная хроматография также сопряжена с множеством трудностей. Во-первых, абсорбируемая жидкость, даже если она не смешивается с подвижной фазой, отчасти в ней растворяется. Поэтому по мере проведения хроматографических опытов количество жидкости на сорбенте постепенно уменьшается, а значит, время удерживания и разрешение уменьшаются. Чтобы избежать этого, подвижные фазы зачастую насыщают модификатором (для этого подвижную фазу приводят в соприкосновение со слоем вещества адсорбированной фазы и постоянно интенсивно перемешивают). Во-вторых, даже малые изменения температуры приводят к существенным изменениям растворимости модификатора в подвижной фазе, при этом совершенно утрачивается воспроизводимость. В-третьих, достичь воспроизводимости по толщине слоя жидкости, адсорбированного пористым веществом, крайне сложно, соответственно, от колонки к колонке будет иметь место большой разброс параметров. И наконец, как уже было сказано, при использовании таких подложек могут сильно сказываться явления массопереноса.

2.5.А.5. Нормально-фазные адсорбенты, модифицированные химическим прививанием. Из числа реактивов, позволяющих изменять силикагелевые подложки химически, первыми были открыты вещества, содержащие неполярные октадецильные функциональные группы. Такой сорбент обладал свойствами, во многом дополнительными по отношению к немодифицированному силикагелю. Поскольку эта фаза неполярная, подвижная фаза чаще всего является полярной или имеет высокое содержание воды. Эти условия как раз обратны по отношению к тем, которых требует работа с

немодифицированными сорбентами. Термины «нормально-фазный» и «обращённо-фазный» возникли именно из разграничения по полярности.

Вскоре у хроматографистов возникла потребность в материалах для более «тонкого» разделения. Были разработаны другие неполярные подложки, в первую очередь на основе октила (C_8), бутила (C_4) и фенила. К сожалению, эти неполярные подложки и высокополярные немодифицированные сорбенты ещё не давали возможности решать все задачи. Потому были найдены способы прививания фаз промежуточной полярности – с циановыми, диольными, амино-, нитрогруппами и многие другие.

Таблица 2.4
Нормально-фазные привитофазные сорбенты

Привитая фаза	Сокращённое обозначение	Структура
Цианопропил	CN	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$
Нитрогруппа	NO_2	$-(\text{CH}_2)_3-\text{C}_6\text{H}_5-\text{NO}_2$
Аминопропил	NH_2	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Диаэтиламиногруппа	—	$-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Диол	—	$-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}_2\text{CHONCH}_2\text{OH}$

При необходимости, для таких подложек указывают содержание углерода и азота. На сегодняшний день привитофазные сорбенты как раз составляют большинство нормально-фазных. В таблице 2.4 приведены некоторые из таких фаз, используемых для неспецифического (то есть не хирального и не по специфическому родству – аффинного) разделения.

Устойчивость, простота изготовления и воспроизводимость характеристик готовых колонок с такими фазами были настолько лучше, чем при использовании немодифицированных фаз и фаз, модифицированных нанесением, что это произвело настоящую революцию в жидкостной хроматографии. Данные фазы позволяют проводить хроматографические опыты в градиентном режиме. Уравновешивание происходит несоизмеримо быстрее, чем на немодифицированных материалах. Благодаря этому, для таких фаз удалось разработать огромное количество методик. Группы веществ, анализируемых при помощи этих методик, включают важнейшие загрязнители окружающей среды, действующие вещества фармацевтических препаратов, природные вещества.

Хотя по определению эти фазы являются полярными, очень быстро выяснилось, что их можно применять и в системах с высокополярными

подвижными фазами. Сорбенты, обладающие промежуточной полярностью использовались там, где применение обычной нормально-фазной хроматографии было невозможно, – для анализа пептидов, белков и широкого спектра действующих веществ фармацевтических препаратов и природных соединений.

Следствием такой *двойственности применения* полярных сорбентов стало некое стирание граней между нормальной и обращённой фазами. Однако на практике чёткость классификации не играет особой роли. Обычно решается вопрос о применимости того или иного метода разделения. Поэтому лучше всего различать методы анализа, указывая, какие сорбенты и подвижные фазы следует применять для данного разделения. При этом всякая путаница будет исключена.

Довольно часто конечные функциональные группы нормально-фазных сорбентов обладают повышенной реакционной способностью по отношению к реактивам, широко используемым для получения производных, таких как хлордиметилсиланам. Как показано на рис. 2.20, многие сорбенты получены на основе триалкоксиалкил-замещённых силанов. Из-за упомянутой реакционной способности конечных функциональных групп окончательное блокирование функциональных групп на поверхности силикагеля («энд-кэппинг») таких сорбентов часто не производится. Селективность и специфичность таких сорбентов можно регулировать, подбирая «нормально-фазную» часть молекул «прививки». Например, цианопропиловая фаза проявляет слабополярные свойства и является слабым акцептором при образовании водородных связей; диольные и аминокислоты сильнополярны и являются сильными акцепторами и донорами при образовании водородных связей; нитрофазы чрезвычайно сильно полярны и выступают в роли сильных акцепторов при образовании водородных связей.

Фторсодержащие молекулы являются нормально-фазными «прививками» формируя сорбенты, находящие достаточно узкие применения. Они

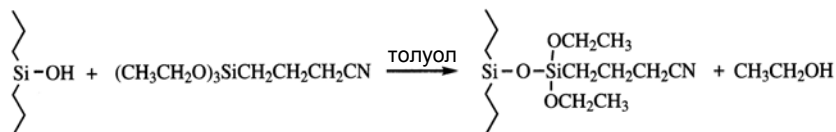


Рис. 2.20. Реакция получения производных триэтоксидицианопропилзамещённого силана с силанольными группами на поверхности силикагеля. Если на поверхности достаточно близко к другим этоксигруппам имеются реакционноспособные силанольные группы, они могут также вступать в реакцию, образуя связанные группы с двумя или тремя связями с поверхностью силикагеля.