



Автор

**Сычев
Константин
Сергеевич**

Научный
редактор

**Курганов
Александр
Александрович**

**Практическое
руководство
по жидкостной
хроматографии**

2010

Оборудование для ВЭЖХ:

- Детекторы: ELSD; UV; рефрактометрические; флуориметры.
- Генераторы азота: для ELSD; LC/MS.
- Автосамплеры; коллекторы фракций.
- Термостаты для колонок.
- Насосы высокого давления.
- Программное обеспечение.

Принадлежности для ВЭЖХ:

- Префильтры.
- Фитинги.
- Принадлежности для работы с подвижной фазой.
- Принадлежности для насосов.
- Клапаны.
- Инжекторы РЕОДАЙН.

Колонки для ВЭЖХ:

Для разделения низкомолекулярных веществ:

Grace®VisionHT™; Grace®GraceSmart™; Grace®GraceAlpha™; Alltech® Alltima™ HP; Alltech® Prevail™; Alltech® Brava™; Alltech® Alltima™; Alltech® Apollo™; Alltech® Econosphere™; Alltech® Adsorbosphere™; Alltech® Allsphere™; Grom™ Sil; Grom™ Sapphire; Grom™ наборы для анализа аминокислот; Jones Genesis®; Jones Apex™; Vydac® Venture®; Vydac® Denali®; Vydac® 201TP; 202TPC18

Для разделения высокомолекулярных веществ:

Vydac® MS; Vydac® Everest®; Vydac® TP; Vydac® ProZap™ C18; Vydac® Venture® A; Alltech® ProSphere™; Alltech®; Macrosphere™;

А также колонки фирм: Brownlee™; Jordi™; Polymer Labs; Shodex®

Колонки для ионной хроматографии

Специальные колонки для ВЭЖХ, приготовленные по специальному запросу заказчиков.

Пустые корпуса для колонок ВЭЖХ; фритты.

Препаративная - Тонкослойная хроматография:

Колонки для препаративной хроматографии: GraceAlpha; Vydac MS; Vydac TP; Alltech

Оборудование для набивки колонок.

Сорбенты для наполнения колонок: GraceAlpha; Vydac; Davisil

Принадлежности и оборудование для препаративной хроматографии:

Трубки; фитинги; насосы; инжекторы; переключающие краны; шприцы.

Тонкослойная хроматография:

Пластины для тонкослойной хроматографии Davisil Silica; GraceResolv;

Alltech Prep-Screen; Alltech Prekotes; Adsorbosil HPTLC; Machery-Nagel; Analtech

Принадлежности для тонкослойной хроматографии

Газовая хроматография/ Оборудование:

- Газовые хроматографы.
- Компьютерные программы.
- Генераторы азота.
- Генераторы водорода.
- Воздушные генераторы.
- Воздушные компрессоры.

Колонки для ГХ:

Капиллярные колонки Alltech; Alltech Heliflex; Alltech Econo-Cap
Капиллярные колонки: Astec; SGE

Принадлежности для газовой хроматографии:

- Универсальные соединения; фитинги; трубки.
- Принадлежности для набивки колонок.
- Оборудование для контроля за утечкой газа.
- Оборудование для очистки и осушения газа.
- Принадлежности для сбора проб газа.
- Ферулы. Фитинги. Септы. Клапаны.
- Принадлежности для ввода проб.

Оборудование и принадлежности для твердофазной экстракции:

- Картриджные колонки.
- Сорбенты для твердофазной экстракции.

Фильтрация:

- Шприцевые мембранные фильтры;
- Флаконы; вials для автосамплеров;
- Капиллярные трубки; принадлежности для работы с капиллярными трубками.

Шприцы Hamilton для хроматографии и пробоподготовки:

Шприцы общего назначения объемом от 2.5 до 500 мкл.

Шприцы с усиленными плунжерами объемом от 5 до 250 мкл.

Шприцы с газоплотным поршнем объемом от 0,5 до 500 мкл.

Специальные шприцы большого объема от 500 до 2000 мл для отбора газовых проб.

Шприцы для всех основных видов автосамплеров.

Вials:

Вials с короткой резьбой; Вials с резьбой на горловине; Вials с горловиной под кримп; Вials с обжимающим кольцом; Вials для автосамплеров WATERS; Вials для парового анализа; EPA вials; Вials для хранения; Септы; Контейнеры и штативы для вials



119602, г. Москва, ул. Никулинская, 27, корп. 3

Тел./факс: +7-495-231-59-00; +7-495-937-50-26

E-mail: info@cheminst.ru

www.cheminst.ru



компьютерная
автоматизация
хроматографии

ЗАО Амперсэнд



МультиХром



детекторы
насосы
автосамплеры
термостаты
аналого-цифровые преобразователи

LIMS
мини-LIMS
веб публикации
печать отчетов
электронные документы
экспорт данных и результатов

Программно-аппаратный комплекс **МультиХром**:
цифровое управление оборудованием -
более 100 приборов различных производителей;
прием и обработка данных;
оформление итоговых документов.

Используется как в лабораторных, так и заводских условиях
для всех видов хроматографии:
газовой, ВЭЖХ, препаративной, эксклюзионной,
тонкослойной, а также для капиллярного электрофореза.

Высокий научный уровень разработок.
Адаптирование версий для задач заказчика.
Метрологическое обеспечение системы.
Регистрация в Госреестре РФ средств
измерений № 13473-04.

*Легкое
освоение
для решения
рутинных задач,
неограниченные
возможности для
решения сложных.*

Гибкая настройка процедур обработки хроматографической
информации и оформления конечных документов.

8-499-196-52-90 support@ampersand.ru www.ampersand.ru



М И Р Х И М И И

К.С. Сычев

Практическое руководство по жидкостной хроматографии

Под редакцией А.А. Курганова

ТЕХНОСФЕРА

Москва

2010

Сычев К.С.

Практическое руководство по жидкостной хроматографии

Москва:

Техносфера, 2010. — 272 с., ISBN 978-5-94836-238-0

Книга написана как практическое руководство, основная задача которого состоит в поэтапном тренинге начинающего специалиста как в области конкретно жидкостной хроматографии, так и в областях аналитической и физической химии в целом. Автор надеется, что руководство поможет специалисту с любым уровнем подготовки пройти путь до квалифицированного аналитика и исследователя, способного разрабатывать методики самой высокой сложности.

© 2010, К.С. Сычев.

© 2010, ЗАО «РИЦ «Техносфера», оригинал-макет, оформление.

ISBN 978-5-94836-238-0



Высокоэффективная Тонкослойная Хроматография

Оборудование и приборы для ВЭТСХ

Скоростной количественный ТСХ-анализ с денситометром-флюориметром «ДенСкан». Области применения: химия, биохимия, медицина.



Высокоэффективная Монолитная Хроматография



Монолитная хроматография позволяет за 1-2 минуты разделить до 20 мг белка с эффективностью ВЭЖХ и масштабировать разделение до нескольких граммов белка или 0,5 г ДНК.

Сорбенты для Высокоэффективной Монолитной Хроматографии (Convective Interaction Media® - CIM®) представляют собой революционные хроматографические материалы, основанные на поперечно-сшитом пористом монолитном полимере, обеспечивающем исключительную химическую стабильность и гидродинамические характеристики.

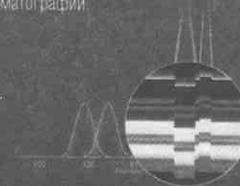
Монолиты поставляются в разной форме с различными привитыми модификаторами. Пригодны для ионообменной, гидрофобной, обращенно-фазовой, аффинной хроматографии.

Научно-технический центр «Ленхром»

199004, С.-Петербург, В.О., Большой пр., 31

тел./факс: (812) 323-6030, 323-7101, 323-5880, 323-6401


E-mail: lenchrom@hq.macro.ru <http://www.lenchrom.spb.ru>



Содержание


Предисловие автора	11
Предисловие научного редактора	13
Отзывы	14
Глава 1. Что такое хроматография?	19
1.1. Физико-химический анализ. Адсорбция. Твердофазная экстракция и хроматография. Проведение хроматографического определения	19
1.2. Жидкостная хроматография низкого и высокого давления. Схема жидкостного хроматографа высокого давления	24
1.3. Как улучшить разделение?	28
1.3.1. Удерживание. Разрешение	29
1.3.2. Селективность – параметр, отражающий физико-химические взаимодействия в хроматографической системе	31
1.3.3. Эффективность хроматографической колонки. Пиковая плотность. Асимметрия пика	33
1.3.4. Связь разрешения с селективностью, эффективностью и фактором удерживания (основная формула хроматографии)	35
Глава 2. Начинаем работать на жидкостном хроматографе	38
2.1. Как управлять временем удерживания?	39
2.1.1. Полярность. Полярные и неполярные растворители и адсорбенты	39
2.1.2. Как происходит удерживание. Что значит «нормальная фаза» и «обращенная фаза»? Элюирующая сила растворителя. Применение для элюирования смесей растворителей различной полярности. Компоненты элюента: основа, добавка и модификатор	42
2.1.3. Зависимость удерживания от состава элюента. Уравнение Скотта	48
2.1.4. Удерживание ионных соединений на обращенной фазе. Модификатор в обращенно-фазовых системах. Универсальные ОФ системы. Примеры универсальных систем	50
2.2. Принципы работы основных узлов хроматографа	56
2.2.1. Насос плунжерного типа. Изократическое и градиентное элюирование. Градиентные системы смешивания при высоком и низком давлении	56
2.2.2. Инжектор	61

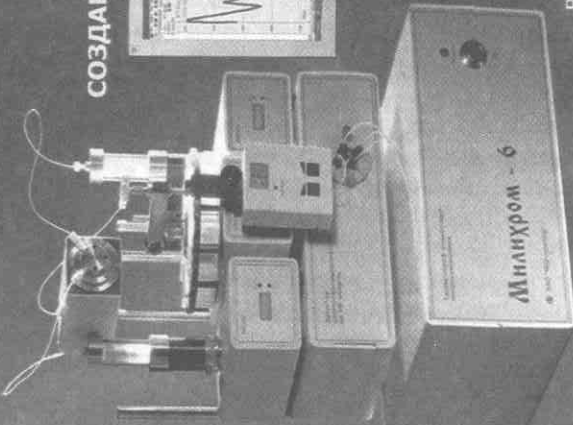
ХРОМАТОГРАФ ЖИДКОСТНЫЙ МИКРОКОЛОНОЧНЫЙ



"МИЛИХРОМ"

СОЗДАННЫЙ ПРЕВОСХОДИТЬ





Идентификация и количественный анализ вредных, токсичных веществ: в воздухе, почве, сточных водах, снежном покрове, продовольственном сырье и продуктах питания.

ЗАО "Научприбор"

Внесен в Государственный реестр средств измерений РФ №29367-05
 Имеет сертификат об утверждении типа средств измерений RU.C.31.004-A № 20963
 Выпускается в соответствии с лицензией Госстандарта РФ №001203-ИР

302020, Россия, г.Орёл, Нагорское шоссе, 40

Тел.: (4862) 45-57-37, 45-57-51, 41-52-46

E-mail: sales@nauchpribor.ru www.nauchpribor.ru

2.2.3. Фотометрический и флуориметрический детекторы. Поглощение УФ излучения растворителями. Другие детекторы для ВЭЖХ	62
2.2.4. Соединение блоков в единую жидкостную систему	69
2.3. Общие рекомендации к проведению хроматографического анализа. Рабочее место. Приготовление элюента. Заполнение насосной системы элюентом. Замена одного элюента на другой, смешивающийся или несмешивающийся с предыдущим. Фильтрация пробы. Применение ин-лайн фильтров и предколонок. Промывка узлов хроматографа	70
2.4. Изократическое и градиентное элюирование. Применение рецикла элюента при изократическом элюировании. Техника градиентного элюирования, «вогнутые» и «выпуклые» профили градиента. Общие рекомендации к проведению градиентного элюирования	73
2.5. Выбор растворителя для приготовления пробы	81
Глава 3. Обработка хроматографических данных	84
3.1. Базовая линия. Высокочастотные и низкочастотные шумы. Сжатие и сглаживание хроматограммы. Отношение сигнал/шум. Предел детектирования (LOD) и предел определения (LLOQ). Дрейф базовой линии	84
3.2. Разметка хроматограммы	89
3.3. Основы качественного анализа. Способы идентификации соединений. Арбитражный метод. Ложноположительный и ложноотрицательный результаты идентификации	92
3.4. Основы количественного анализа	102
3.4.1. Градуировка. Метод внешнего стандарта. Метод внутреннего стандарта, его преимущества и ограничения	102
3.4.2. Погрешность измерения. Случайная и систематическая погрешности. Термины по ГОСТ ИСО 5725: точность (accuracy), правильность (trueness), прецизионность (precision), повторяемость (repeatability), воспроизводимость (reproducibility). Вычисление доверительного интервала. Источники случайной погрешности. Вклад влияния шума детектора в общую погрешность измерения. Источники систематической погрешности. Что такое «неопределенность измерения»?	107
3.4.3. Одноточечная градуировка	111
3.4.4. Многоточечная градуировка. Применение линейной и нелинейной регрессии; критерии приемлемости аппроксимации	114
3.4.5. Полуколичественные измерения	118

Хроматографическая компания Элсико

Мы успешно работаем с 1987 года на рынке России и СНГ.
Поставляем в кратчайшие сроки для предприятий нефтегазохимического комплекса, медико-фармацевтических, энергетических, экологических предприятий и организаций оборудование для современного экспрессного аналитического контроля методом жидкостной, ионной и тонкослойной хроматографии.



□ Сборка и поставка хроматографических систем под Вашу задачу. Аналитические и препаративные ВЭЖХ системы собираются в срок от 10 дней. Базовый жидкостный хроматограф (цена 500 тысяч рублей с налогами) может анализировать токсины, органические кислоты, стероиды, гормоны, олигонуклеотиды, пептиды, белки, лекарства, оптические изомеры, пищевые добавки. Гарантия на поставляемое оборудование составляет 1 год. Поставка комплектующих и запасных частей не менее 5 лет.

□ Диагностика и ремонт оборудования для жидкостной хроматографии. Быстрая поставка запчастей к хроматографам Waters, Beckman, Gilson, Shimadzu и других. Поставляем поршни, клапаны, уплотнения, дейтериевые лампы, электронных платы, в том числе как со склада в Москве и на заказ.

□ Упаковка и перепакровка ВЭЖХ колонок. А также поставка аналитических и препаративных колонок фирм Waters, Agilent, Phenomenex, Supelco, Dr. Maisch, Dionex, Tosoh, Bio-Rad, Macherey-Nagel, GE Healthcare и других с сорбентами Diasorb, Silasorb, Separon, Inertsil, u-Bondapak, Eurosphere, Reprosil, Nucleosil, Zorbax, Lichrosorb, Lichrospher, Spherisorb, Partisil, Hypersil, Kromasil и др. со склада в Москве и на заказ.

ЭЛСИКО

107564, Россия, Москва,
ул. Красногатырская, д. 42, офис 222а
Тел.: (495) 210-1888, 518-0407; факс (495) 963-3972
E-mail: mail@HPLC.ru <http://www.HPLC.ru>

3.4.6. Контроль коэффициентов извлечения при помощи метода внутреннего стандарта. Применение стандартов-суррогатов (surrogate standard) и стандартов выхода (recovery standard)	119
3.4.7. Валидация хроматографических методик	121
Глава 4. Оптимизация хроматографического определения	123
4.1. Основы теории процесса разделения в ВЭЖХ	123
4.1.1. Теория скоростей и уравнение Ван-Деемтера. Кинетика массопередачи в хроматографической системе. Зависимость Энделя и Халаша	123
4.1.2. Уравнение Дарси	127
4.2. Регулирование основных параметров хроматографического анализа	128
4.2.1. Способы увеличения эффективности разделения	128
4.2.2. Способы сокращения времени анализа	132
4.2.3. Способы повышения чувствительности анализа (уменьшения предела определения целевых соединений)	134
4.3. Алгоритмы оптимизации хроматографического разделения ...	137
Глава 5. Виды жидкостной хроматографии. Управление селективностью разделения. Неподвижные фазы для ВЭЖХ	142
5.1. Неподвижные фазы (НФ) для жидкостной хроматографии	142
5.1.1. Архитектура (физическая структура) современных неподвижных фаз (НФ) для жидкостной хроматографии	142
5.1.2. Особенности строения современных обращенно-фазовых НФ на основе силикагеля. Способы улучшения химической инертности, гидролитической стабильности, устойчивости к фазовому коллапсу. Высокий и низкий ценовые сегменты для обращенных фаз. Тестирование неподвижных фаз, тестовые смеси для обращенно-фазовых НФ. Крэш-тесты	144
5.1.3. Перспективные направления синтеза новых НФ. Фазы, устойчивые в широком диапазоне pH. Фазы с ограниченно доступной поверхностью. Фазы для высокотемпературной хроматографии	151
5.2. Обращенно-фазовая хроматография (ОФ ВЭЖХ), ее преимущества и закономерности. Модель удерживания в ОФ ВЭЖХ	153
5.3. Нормально-фазовая хроматография (НФ ВЭЖХ) и ее основные закономерности. «Диполь-полевая» модель удерживания в НФ ВЭЖХ. Неподвижные фазы для НФ ВЭЖХ	160
5.4. Гидрофильная хроматография (HILIC). ДИРФ режим	171



ХРОМОС

ХРОМАТОГРАФ ЖИДКОСТНЫЙ «ХРОМОС ЖХ-301»

Госреестр средств измерений № 21433-08.

Изготовитель ООО «Хромос», Россия, г. Дзержинск.

Жидкостный хроматограф «Хромос ЖХ-301»

собирается в основном из импортных готовых узлов,

- это дает преимущество перед всеми отечественными производителями жидкостных хроматографов по надежности работы и качеству проводимых анализов;
- блочно-модульное исполнение позволяет наращивать возможность прибора за счет дополнительных блоков (детекторов, кранов, колонок);

В комплектацию хроматографа используются:

Насосы высокого давления SSI серии III (Lab Alliance, США) или «Альфа» (Чехия)

- диапазон регулируемых расходов от 0,01 до 10 мл/мин;
- максимальное допустимое давление насоса - 360 кгс/см²;
- воспроизводимость расхода элюента не более 0,2%.

Дозаторы пробы ЕС-1010 (США) или D-4 (Чехия)

- сменная петля от 5 до 200 мкл;
- рабочее давление 350 кгс/см²;
- кабель для «Стоп-старт» сигнала.

Детекторы:

спектрофотометрические «Сапфир-600» (Чехия), Shimadzu (Япония)

- рабочий спектральный диапазон 200-600 нм;
- уровень шумов на пустой кювете на 240 нм $1,25 \cdot 10^{-5}$ единиц оптической плотности;

рефрактометрический (США)

- рефрактометрический диапазон 1-1,7 единиц рефракции;
- уровень шума менее $2,5 \cdot 10^{-9}$ единиц рефракции;

флуориметрические Waters (США), Shimadzu (Япония)

- диапазон длин волн 200-650 нм (опционально 200-900);

кондуктометрический (Россия)

- предел детектирования по хлору $1 \cdot 10^{-9}$ г/мл;

электрохимический (Россия)

- предел детектирования по фенолу не менее 0,5 мкг/л.

Термостат колонок (Россия)

- диапазон регулирования температуры в термостате (комн.+10°C)-100°C.

Жидкостные коммуникации РЕЕК (США) из полиэфиркетона, обладающие высокой химической стойкостью и инертностью. **Хроматографические колонки** зарубежного и отечественного производства.

гарантийный и послегарантийный ремонт осуществляется специалистами
ООО «Химаналитсервис».

606002, Россия, Нижегородская область, г. Дзержинск, улица Лермонтова 20 корпус 83

Телефон: (8313)249-200, 249-300, 245-786, 245-788

E-mail: mail@has.ru

<http://has.ru>

5.5. Ионная хроматография	176
5.6. Хроматография с переносом заряда	180
5.7. Эксклюзионная хроматография	185
5.8. Ион-парные режимы хроматографии. Мицеллярная хроматография	192
Приложение А. Метод жидкостной хроматографии	
как объект исследования	198
А.1. Вводный курс лекций по общей химии	198
А.1.1. Модель как способ познания мира	198
А.1.2. Модель химии как науки	200
А.1.3. Понятие о веществе. Силы, приводящие к образованию макротел	202
А.2. Физико-химические взаимодействия в хроматографической системе	205
А.2.1. Дипольные взаимодействия	208
А.2.2. Водородная связь	210
А.2.3. Модель выталкивания из структурированной среды	213
А.2.4. Ионные взаимодействия	213
А.2.5. Дисперсионные взаимодействия	214
А.2.6. Взаимодействия с переносом заряда (π -взаимодействия)	215
А.2.7. Координационные взаимодействия	216
А.3. Типы удерживания в жидкостной хроматографии	216
А.3.1. Логическая связь между типом удерживания и видом хроматографии	219
А.3.2. Расчет количественных характеристик типов удерживания (дескрипторов удерживания) при помощи метода факторного анализа	222
Приложение Б. Хиральная высокоэффективная жидкостная хроматография	226
Б.1. Основные типы хиральных неподвижных фаз	226
Б.2. Закономерности хиральной ВЭЖХ	231
Приложение В. Список международных сокращений, принятых в хроматографии	238
Высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия компании Waters	243
Возможности хромато-масс-спектрометров корпорации Termo Fisher Scientific	248
LaChrom Elite — решение Hitachi High Technologies для высокоэффективной жидкостной хроматографии	262
Жидкостные хроматографы «Стайер»: этапы создания и современный взгляд	267

Предисловие автора



Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является эффективным методом аналитического контроля и экспертизы. В частности, этот инструментальный метод химического анализа широко применяется в таких контролирующих организациях, как:

- службы санитарно-эпидемиологического контроля, профильные лаборатории контроля безопасности и выявления фальсификаций пищевых продуктов;
- службы контроля безопасности и выявления фальсификаций лекарственных препаратов;
- службы контроля за распространением наркотиков, наркологические диспансеры, службы криминалистической и судебно-медицинской экспертизы;
- водоканалы, службы экологического контроля предприятий и профильные экологические контролирующие организации.

Для применения ВЭЖХ в промышленности сложно выделить какие-либо конкретные ниши; метод может с успехом использоваться везде, где имеют дело с органическими материалами и веществами. Он применим для контроля качества готовой продукции или закупаемого сырья, для проведения исследований, разработок новых видов продукции или новых технологических схем. Кроме того, препаративная жидкостная хроматография сама по себе может являться средством производства — прежде всего, в фармацевтической индустрии.

Таким образом, хроматографию можно по праву считать обособленной научно-технической отраслью, возникшей на тесном стыке науки, техники и прикладных разработок.

Как и любая наукоемкая отрасль в России, хроматография значительно пострадала в течение «смутного времени» девяностых, однако в настоящее время она достаточно уверенными темпами возрождается. Основными факторами роста являются развитие промышленного производства и курс государства на повышение уровня безопасности жизнедеятельности населения.

Определенный парадокс заключается в том, что основным препятствием в развитии хроматографии сейчас является не столько нехватка оборудования или средств на его приобретение, сколько острая нехватка квалифицированного персонала. Причем, она имеет не только количественный, но и выраженный качественный характер: для внедрения хроматографии в промышленности недостаточно просто обслуживать

приборы — необходимо разрабатывать новые аналитические методики с применением этих приборов. Разработка же методик требует от специалистов ряда очень специфических знаний, которые невозможно (то есть в России сейчас невозможно) получить принципиально нигде. Не хватает в нашей стране и книг по хроматографии.

Данное практическое руководство создано для того, чтобы как-то восполнить этот пробел: помочь начинающим специалистам в освоении хроматографической техники, а специалистам более опытным — посодействовать в разработке аналитических методик. Несколько необычным может показаться читателю стиль книги, максимально приближенный к диалогу (например, разговору друзей по лаборатории). Идея состояла в том, что, в отличие от академического стиля, при такой подаче материала знания станут значительно легче применять на практике. Задача-максимум состояла в том, чтобы практическое руководство позволяло не просто получать знания, а тренировать навыки работы. Надеюсь, что задача, пусть и неполностью, но выполнена — по мере наших сил и возможностей.

«Наших», поскольку в создании практического руководства сумел — явно или неявно, в большей или меньшей степени — отметить целый коллектив авторов. Проект был задуман еще в 2003 году и в шутку назывался «СССР», по первым буквам фамилий авторов: Сапрыкин, Сычев, Сычев и Рудаков. Исторически, проект распался на четыре самостоятельных части; книги Леонида Викторовича Сапрыкина, Сергея Николаевича Сычева и Олега Борисовича Рудакова уже вышли в печать (надеюсь, читатель с ними знаком). Таким образом, данное практическое руководство является четвертой книгой проекта и символически его завершает, давая путь новым идеям и новым проектам.

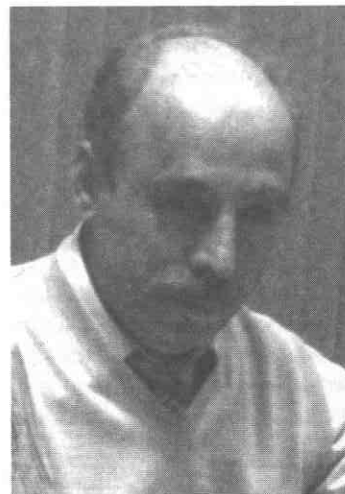
Часть А.1 Приложения А руководства, посвященная общим принципам моделирования в науке и в химии в частности, была написана на основе лекций Сергея Николаевича Сычева по общей химии, читаемых студентам нехимических специальностей. Автору показалось, что без такой полезной частички прикладной философии книге не обойтись.

Огромную благодарность хочу выразить Александру Александровичу Курганову, который профессионально, очень быстро и в удобном для автора формате произвел научное редактирование книги. Много ценных замечаний по 3-й главе сделала Алена Юрьевна Михеева; некоторые моменты из 3-й главы прокомментировал Юрий Анатольевич Каламбет — им тоже огромное спасибо! Во 2-й главе часть справочных материалов взята из книги Олега Борисовича Рудакова, а в 5-й главе большая доля материалов по жидкостно-жидкостной хроматографии (ДИРФ-режим) взята из книги Леонида Викторовича Сапрыкина.

Спасибо всем, кто болел за эту книгу! И отдельная благодарность рекламодателям, без поддержки которых она не смогла бы выйти в свет. Удачи!

Сычев Константин Сергеевич,
к.х.н., индивидуальный предприниматель

Предисловие научного редактора



В современной аналитической химии ведущее положение занимают инструментальные методы анализа, поскольку они в полной мере отвечают все возрастающим требованиям со стороны науки и практики к точности, экспрессности и универсальности проведения анализов. Хроматография, в ряду методов инструментального анализа, является наиболее мощным методом разделения и анализа сложных смесей соединений, и она широко использует другие инструментальные методы, например, спектрометрию или электрохимию, для качественной и количественной оценки результатов хроматографического разделения.

Среди различных вариантов хроматографического анализа очень широкое применение в последние десятилетия получила жидкостная хроматография, в первую очередь благодаря возможности анализа сложных смесей биобъектов, таких как белки, нуклеиновые кислоты, антиоксиданты, фармпрепараты и т.д.

Предлагаемая книга позиционируется ее автором как практическое руководство к проведению жидкостного хроматографического анализа. Автор книги давно и успешно работает в области жидкостной хроматографии, и приводимый в книге материал основан, прежде всего, на его личном опыте. Несомненно, книга представит интерес как для тех, кто только еще собирается вступить на путь применения хроматографического анализа, так и для тех, кто уже давно и хорошо знаком с этим методом.

Читатели первой группы найдут в книге подробное объяснение устройства жидкостного хроматографа и общую методику проведения хроматографического разделения. Здесь отмечены наиболее часто встречающиеся ошибки и пути по их устранению. Читателям второй группы будут интересны общетеоретические вопросы и вопросы номенклатуры и определений в жидкостной хроматографии. Представляется, что эта часть книги вызовет определенную дискуссию в кругах хроматографистов, которая послужит делу дальнейшего углубления и расширения наших представлений о хроматографической науке.

Курганов Александр Александрович,
д.х.н., зав. лабораторией хроматографии ИНХС РАН, г. Москва

Отзывы



Михеева Алена Юрьевна,
к.х.н., ведущий специалист Центра исследования
и контроля воды (ЦИКВ), г. Санкт-Петербург

Книга написана простым и понятным языком, и это выгодно отличает ее от множества других изданий, посвященных хроматографии. Все сложные вопросы изложены четко и ясно. Кроме того, дано множество ценных практических рекомендаций.



Харлампович Татьяна Анатольевна,
начальник исследовательской
лаборатории ЗАО «Эвалар», г. Бийск

Оригинально, ново, доступно! И, главное, с учетом современных тенденций в развитии хроматографии. В книге очень хорошо выдержан принцип «от простого к сложному», освещены часто встречающиеся хроматографические трудности и предложены практические советы по их преодолению.

В наше время, когда жидкостная хроматография становится более доступной и востребованной, книга может стать хорошим советчиком и попутчиком как для начинающих хроматографистов, так и для специалистов со стажем. С удовольствием будем изучать и использовать в работе почерпнутые знания.



Рудаков Олег Борисович,
д.х.н., профессор, зав. кафедрой химии ВГАСУ,
г. Воронеж

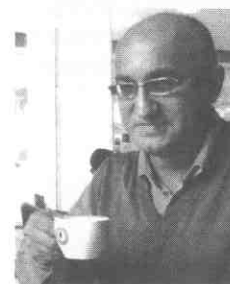
После первой отечественной книги «Хроматография», в которой замечательный советский ученый Константин Чмутов популярно рассказал об этой группе гибридных методов разделения-анализа, прошло более тридцати лет. За это время хроматографические методы заняли лидирующее место в инструментальном анализе веществ, особенно методы жидкостной хроматографии. Вместе с тем в

России книг, руководств и пособий по приемам работы на современных жидкостных хроматографах практически нет, а те, что появлялись, выходили мизерными тиражами, сразу превращаясь в раритет.

Обычно учебные пособия пишутся в псевдоакадемическом стиле, где за строгими дефинициями следует скучное описание поднимаемой темы. Книга К. Сычева, по моему мнению, — одна из немногих удачных попыток доходчиво, буквально на пальцах, с яркими примерами, часто в форме диалога с читателем, рассказать о жидкостной хроматографии, об азах и секретах практической работы на сложном хроматографическом оборудовании. К. Сычев приводит в своей книге большое количество полезных рекомендаций, он снабдил ее необходимым минимумом справочных данных, вместе с тем не перегружая ими книгу.

Наряду с присущим нынешнему поколению хроматографистов прагматизмом автор подходит к подаче материала креативно, порой используя для интерпретации результатов хроматографического разделения свежие, но еще не общепризнанные теоретические представления о механизмах удерживания в тех или иных хроматографических системах. К. Сычев, будучи учеником такого специалиста с мировым именем в области жидкостной хроматографии, как Вадим Даванков, перенял от него смелость и философичность суждений. Другим его учителем является отец — Сергей Сычев, профессор Орловского технического университета, один из разработчиков микроколоночной хроматографической системы «Милихром», от которого он унаследовал полемичность и желание докопаться до физических первопричин сорбционных процессов. Следует отметить еще одного самобытного ученого с энциклопедическими знаниями, краснодарского хроматографа Леонида Сапрыкина, который, безусловно, повлиял на творчество К. Сычева. В постоянных дискуссиях между ними на форуме www.anchem.ru родилась не одна интересная идея.

Таким образом, книга может быть рекомендована не только начинающим, но и профессиональным хроматографистам, она особенно полезна студентам, магистрантам и аспирантам, изучающим инструментальные методы контроля качества и безопасности пищевой, бытовой и фармацевтической продукции.



Ризванов Ильдар Хамидович,
к.х.н., зав. лабораторией физико-химического
анализа ИОФХ КНЦ РАН, г. Казань

С большим интересом прочел главы давно ожидаемой книги по практической жидкостной хроматографии. Как я понимаю, публикация уже не за горами, с чем я и хочу поздравить автора.

Впечатления у меня в целом положительные. Хроматографические методы анализа по своей распространенности, доступности и информативности не имеют себе равных, приборная база постоянно совершенствуется, поэтому потребность в современных пособиях еще не скоро пропадет. И появление такой книги лишним, конечно же, не будет.

В последнее время я стал довольно часто использовать ОФ ВЭЖХ для отделения интересующих меня соединений с целью их последующего анализа методом МС. Методика эта, к счастью, далеко не нова, относительно проста в исполнении, поэтому дает хорошие результаты и существенно облегчает проведение анализов.

Здесь лично для меня подобная книга представляет большой интерес, поскольку раскрывает аналитические подходы для разделения смесей разных типов, которые, думаю, будут мной использованы. Приведенные в книге практические примеры и пояснения к ним довольно удачно вписываются по ходу текста, поэтому легко воспринимаются.

Если говорить о замечаниях, то их у меня много и касаются они главным образом применения разговорных выражений. Высказывать сейчас я их не буду — хотелось бы увидеть вариант, согласованный с рецензентами. Желаю автору дальнейших успехов!



Федоров Евгений Константинович,
PhD, Senior Director, Research and Development
WARNEX Bioanalytical Services, Laval, QC, Canada

В целом, впечатление от книги у меня положительное. Для начинающего хроматографиста, не знакомого с методом и прибором, книга будет ценным пособием, позволяющим самостоятельно научиться практическим основам высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В то же время, она дает достаточно глубокую проработку физико-химических основ метода во всех его вариантах, что должно помочь читателю и в вопросах разработки и оптимизации трудных разделений. Книга побуждает читателя к более глубокому изучению всех вопросов по научным публикациям.

Таким образом, практическое пособие будет полезно не только для начинающих хроматографистов, желающих быстро и самостоятельно овладеть методом, но и для более опытных химиков-аналитиков, желающих расширить свой кругозор.



Сычев Сергей Николаевич,
д.т.н., профессор кафедры «Химия» ОГТУ

Книгу прочитал с большим интересом, тем более, что написал ее мой сын, к работе которого я отношусь весьма критично. При первом прочтении бросилось в глаза использование не совсем, казалось бы, корректной терминологии. Попробовал переписать некорректности сам: получи-

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

**Мировой лидер в производстве
оборудования для ВЭЖХ и масс-спектрометрии**

Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
Тел./факс: +7 (495) 727 44 90, 336 70 00

<http://www.waters.com>
e-mail: waters@co.ru



НОВЫЕ КНИГИ



Пупышев А.А.

Атомно-абсорбционный спектральный анализ

Москва:

Техносфера, 2009. — 784 с., ISBN 978-5-94836-231-1

Рассмотрены теоретические основы атомно-абсорбционного спектрального анализа, основные схемы измерений с использованием селективных источников света и ламп с непрерывным спектром, принципы действия и характеристики главных блоков атомно-абсорбционных приборов, различные способы реализации метода, включая пламенную и электротермическую атомизацию элементов, техники «холодного пара» и гидридов, атомизацию в тлеющем разряде, проточно-инжекционный анализ. Основное внимание при этом уделено термохимическим процессам, протекающим в атомизаторах с участием аналитов, матрицы пробы и химических модификаторов, оптимальным условиям измерений, помехам проведения анализа и способам их устранения. Приведены систематизированные данные по получению градуировочных функций, подготовке проб и растворов сравнения, текущему уходу за прибором.

Изложены теоретические представления по термодинамическому моделированию термохимических процессов в пламенных и электро-термических атомизаторах. Проиллюстрированы возможности этого теоретического метода исследования и подробно изложен алгоритм моделирования для решения практических аналитических задач в области атомно-абсорбционного спектрального анализа.

ИНФОРМАЦИЯ О НОВИНКАХ:
www.technosphera.ru



Как заказать наши книги?

По почте: 125319 Москва, а/я 91

По факсу: (495) 9563346

E-mail: knigi@technosphera.ru

sales@technosphera.ru

лось, что к каждому «корректному» термину нужно еще писать пояснения в объеме 10–15 страниц текста. Когда объем комментариев начал приближаться к 150 страницам убойного научного текста — понял, что Константин прав. К счастью, не успел наговорить резкостей. С удовольствием дочитал книгу до конца и оценил труд и настойчивость автора.

Книгу надо публиковать, потому что получается интересная работа, в ряде случаев не только помогающая начинающим специалистам, но и заставляющая иногда «попыхтеть» и полемистов от хроматографии и межмолекулярных взаимодействий.



Сапрыкин Леонид Викторович,

к.х.н., зав. лабораторией физико-химических методов анализа ОАО «НИПИгазпереработка», г. Краснодар

Вот мы, наконец, дождались компиляции богатого хроматографического опыта Константина Сычева в виде самобытной и, несомненно, полезной книги.

Сразу обращает на себя внимание далекий от академического стиль изложения, больше напоминающий кулуарную беседу автора с читателем. Мне это чем-то напомнило книги Е. Айсберга, известного популяризатора науки и техники.

Автор небезуспешно попытался на простых примерах и аналогиях донести до читателя достаточно сложные понятия из теории и практики ВЭЖХ. Это же делает книгу несколько эклектичной, поскольку в ней соседствуют как максимально упрощенные понятия и рассуждения, так и логические выкладки, доступные для понимания лишь достаточно опытному специалисту. Прослеживается стремление охватить и осветить все мыслимые аспекты теории и практики ВЭЖХ. Где-то это удается лучше, где-то не вполне удачно. Иногда не хватает строгости и структурированности поданной информации.

Тем не менее, книга является ценным пособием как для начинающих хроматографистов, так и для опытных пользователей этого универсального метода разделения и анализа веществ. Мне сложно даже выделить целевую аудиторию этого труда, но то, что она будет достаточно широка, сомневаться не приходится.

В книге очень много информации практического плана, которая обязательно будет востребована широким кругом аналитиков и поможет им сохранить свое время, нервы и ресурс хроматографического оборудования.



Семенов Сергей Юрьевич,
к.ф.-м.н., директор Российского НИЦ
чрезвычайных ситуаций ФМБА России, г. Москва

Как сказано в аннотации к монографии, «задача состояла в том, чтобы написать «настольное» руководство по практической работе, одинаково полезное для специалистов различного уровня подготовки — от достаточно хорошего до самого начинающего».

С поставленной задачей автор справился вполне, и в книге удалось осветить все необходимые сведения о методе хроматографии, принципах работы элементов хроматографа, дать рекомендации к проведению хроматографического анализа и сообщить важнейшие справочные данные по всем ключевым вопросам жидкостной хроматографии. Изложенный в книге материал легко воспринимается и читается с большим интересом. Большое количество иллюстраций очень помогает читателю в понимании излагаемого материала. Специальные термины русского и англоязычного происхождения всегда сопровождаются необходимыми определениями и комментариями.

Наиболее интересной для меня в монографии является глава «Виды жидкостной хроматографии. Управление селективностью разделения. Неподвижные фазы для ВЭЖХ». Здесь наряду с разбором особенностей различных модификаций метода жидкостной хроматографии присутствует богатый экспериментальный материал, снабженный большим числом иллюстраций. Многие специалисты, применяющие метод жидкостной хроматографии для идентификации веществ разнообразной природы, найдут в этом разделе для себя много полезного и важного.

ГЛАВА 1

ЧТО ТАКОЕ ХРОМАТОГРАФИЯ?

Это первая глава книги, которая доступно отвечает на вопросы «Что такое физико-химический анализ?» и «Что такое хроматография?»

Сложные термины я старался вводить постепенно, по ходу текста, каждый раз комментируя их значение. Отмечу, что не только все термины, но и просто слова из специфического лексикона при первом их появлении в тексте выделялись курсивом. Так, выделения удостоились не только существительное «адсорбция» (это термин), но и глагол «переносить». Это потому, что вещество в стакан не засыпается, насыпается или кладется, а «навеска вещества переносится в стакан». И привыкать к этому лучше сразу — переучиваться сложнее. Некоторые важные термины будут сразу даваться на русском и английском языках.

1.1. Физико-химический анализ. Адсорбция.

Твердофазная экстракция и хроматография. Проведение хроматографического определения

Начнем с «физико-химического анализа». Ключевое слово здесь — «анализ», что в переводе с греческого обозначает «разделение». Другими словами, анализ проводится с целью что-то разобрать и выяснить, что из чего состоит. Нас интересует конкретно анализ вещества, причем вещество может быть каким угодно. К примеру, сладким чаем. Здесь сладкий чай — это *объект* анализа.

Вот, допустим, на столе стоит стакан с жидкостью (я знаю, что там налито, но вам пока не скажу). На стакане написано «№ 043». Это *образец* номер 043, или *проба* номер 043 (на английском оба термина обозначаются словом sample). Посмотрим на жидкость. Она коричневая (это свойство «заварки»). На запах — пахнет чаем (свойство «заварки»). Возьмем стакан и немного взболтаем жидкость. По плотности и вязкости можно предположить, что основа жидкости — вода. Попробуем жидкость на вкус и окончательно убедимся, что основа жидкости — действительно вода.

Также мы почувствуем, что жидкость сладкая (свойство сахара) и имеет вкус чая (свойство «заварки»). Вывод: в стакан налит сладкий чай.

Только что мы провели простейший анализ вещества, а именно: образца объекта «сладкий чай» с номером 043. В результате анализа мы поняли, что оно собой представляет, то есть мы *идентифицировали* объект. Это удалось сделать благодаря тому, что мы изучали его физические и химические свойства. Поэтому этот анализ с полным правом можно назвать физико-химическим. По отдельным свойствам мы сначала догадались, какие именно составляющие компоненты присутствуют в жидкости. А уже по списку составляющих компонентов догадались (*сделали заключение*) о том, что есть эта жидкость.

В этом случае, однако, мы не разделяли компоненты фактически. Мы всего лишь замечали индивидуальные свойства компонентов, наблюдая за их смесью. Но можно все сделать иначе. К примеру, методами перегонки, экстракции и осаждения действительно разделить сладкий чай на составляющие его воду, сахар и «заварку». Это будет гораздо сложнее, но зато надежнее и информативнее. Мы будем иметь не косвенные, а прямые доказательства своей правоты — выделенные в чистом виде компоненты, которые раньше находились в смеси.

По такому принципу, в частности, работает и хроматографический метод. В этом физико-химическом методе вещество также разделяется на составляющие компоненты, но не за счет перегонки, экстракции или осаждения. Хроматография основана на явлении распределения вещества между двумя несмешивающимися фазами. В том случае, когда одна из фаз является твердым веществом, процесс распределения называют *адсорбцией* (adsorption).

Адсорбция — это процесс преимущественного концентрирования вещества твердой фазой, которую в этом случае называют *адсорбентом* (adsorbent). Разные химические вещества концентрируются адсорбентами в разной степени, что и положено в основу их разделения.

Для иллюстрации адсорбции можно провести очень простой опыт. Для этого всего лишь нужно пропустить крепкий сладкий чай через любой бытовой фильтр для очистки воды со свежей кассетой. Раствор, прошедший через фильтр, (фильтрат), будет почти бесцветным, но не менее сладким, чем исходный чай. Все дело в том, что кассета бытового фильтра заполнена смесью двух адсорбентов: активированного угля и ионообменного пористого полимера. Они достаточно эффективно адсорбируют из воды пигменты (красители) чая, а вот удалить из воды сахар им не по силам. Так что условно можно считать, что нам удалось адсорбционно разделить сладкий чай на сладкую воду и «заварку».

Только что мы провели типичный эксперимент по *твердофазной экстракции* (solid-phase extraction), или сокращенно *ТФЭ* (SPE). Как правило, ТФЭ применяется не для анализа непосредственно, а для предварительной *очистки* (sample clean-up) или концентрирования компонентов образца перед анализом, то есть для *подготовки пробы* (sample preparation). Кассета с адсорбентом в случае ТФЭ называется *адсорбционным картриджем* (cartridge).

Но, разумеется, разделить все компоненты смеси таким образом нельзя, поскольку на картридж постоянно подается раствор со смесью веществ. Провести полное разделение становится возможным, если через слой адсорбента с нанесенной смесью веществ пропускать чистый растворитель. Такой вариант адсорбционного разделения представляет собой один из подвидов *хроматографии* (chromatography). В хроматографии кассету с адсорбентом принято называть *хроматографической колонкой* (column), а наполняющий ее адсорбент (packing) *неподвижной фазой* (stationary phase). Чистый растворитель или смесь растворителей, которые пропускаются через колонку, называют *элюентом* или *подвижной фазой* (mobile phase). Сам процесс пропускания элюента через хроматографическую колонку называется *элюированием* (elution).

Чтобы все стало понятно, предлагаю провести небольшой мысленный эксперимент по хроматографическому разделению. К примеру, нам надо полностью разделить смесь трех красителей: зеленого, синего и красного. Разумеется, смесь этих красителей — черного цвета. Пусть у нас будут в распоряжении хроматографическая колонка из стекла (чтобы было можно наблюдать за разделением) с подходящим адсорбентом и подходящая смесь растворителей, то есть элюент.

Аккуратно нанесем часть образца (пробу) в верхнюю часть хроматографической колонки и начнем пропускать через колонку приготовленный элюент (см. рис. 1.1). Если адсорбент не очень мелкий, с зернением не менее 100 микрон (100 мкм = 0,1 мм), то элюент будет проходить через слой адсорбента просто под собственной тяжестью. Таким образом, мы пока избежим необходимости *насосной системы* (pump).

Мы будем наблюдать как за колонкой, так и за вытекающим из хроматографической колонки фильтратом, который называется *элюатом*. При этом попытаемся сделать наше наблюдение если не количественным, то хотя бы полуколичественным. Используя зрение как *детектор* (detector), мы будем строить график насыщенности цвета капель элюата от времени с момента начала анализа.

Итак, анализ начинается в момент *подачи* элюента (рис. 1.1а). Через некоторое время t_1 (рис. 1.1б) мы наблюдаем следующую картину: проба разделилась в колонке на три *хроматографических зоны* — зеленую, синюю и красную — по числу компонентов в образце. Это значит, что смесь

красителей разделилась полностью. Ближе к началу колонки (то есть в ее верхней части) находится зона зеленого красителя, в середине — зона синего красителя и уже в самом конце колонки — зона красного красителя. Такая картина наблюдается потому, что зеленый краситель адсорбируется сильнее всего (говорят, что он сильнее всего *удерживается* адсорбентом), в результате чего его хроматографическая зона передвигается вдоль колонки с наименьшей скоростью. Красный же краситель слабо удерживается адсорбентом, поэтому он выходит из колонки (*элюируется*) первым.

Факт элюирования красного красителя с колонки следует надлежащим образом зафиксировать на графике. Сначала мы увидим, что цвет первых капель очень слабый. Он будет нарастать, и в какой-то момент насыщенность цвета будет максимальной. Затем цвет капель опять пойдет на убыль. В результате, сигнал от красного компонента образца на графике будет иметь форму колокола. Такой сигнал называется *пиком* (peak). Время, соответствующее максимуму пика красного красителя, будет называться *временем удерживания* (retention time) красного красителя.

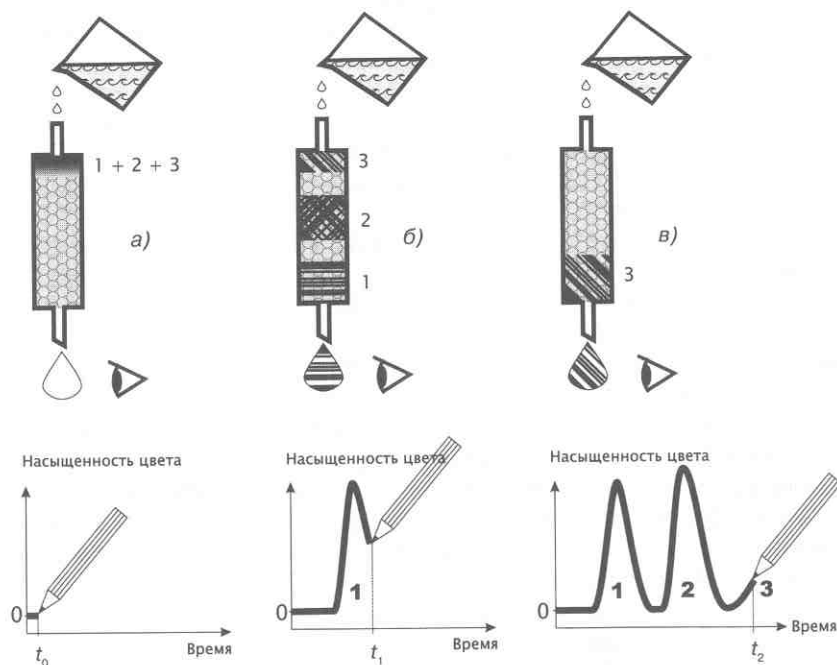


Рис. 1.1. Хроматографическое разделение смеси трех красителей

К некоторому моменту времени t_2 (см. рис. 1.1в) красный и синий красители уже вышли из колонки, а зеленый только начинает выходить. На графике, соответственно, видны два пика — и третий только начинает прописываться. График с пиками называется *хроматограммой* (chromatogram). Хроматограмма является основным результатом хроматографического анализа.

Как показывает практика, в большинстве случаев совсем необязательно разделять все компоненты сложной смеси, число которых может достигать сотен и тысяч. Достаточно выделить из исследуемого вещества лишь интересующие нас компоненты. Такие компоненты называют *аналитами* (analysts), или *целевыми соединениями*, а сам анализ конкретных компонентов — *определением*. Допустим, в приведенном выше примере нас интересовало определение только зеленого красителя. Тогда было бы совершенно неважно, отделился ли красный краситель от синего — главное, чтобы пик зеленого красителя хорошо отделился от всех остальных. Таким образом, все компоненты, которые элюируются рядом с целевыми соединениями и могут помешать правильному определению, называются *мешающими соединениями* (contaminants). Если в образце присутствует множество мешающих соединений, то либо от них надо избавляться на стадии очистки пробы, либо подбирать такие условия разделения и детектирования, чтобы гарантировать правильность выполнения определения.

Определение может быть качественным и количественным. Результаты *качественного определения* (identification) отвечают на вопрос: «Есть ли целевое соединение в образце или нет?» (на нижнем пределе детектирования для данного метода анализа). Для хроматографии этот вопрос можно перефразировать так: «Есть ли пик целевого соединения на хроматограмме или нет?»

Результаты *количественного определения* (quantification) отвечают на вопрос: «Какое количество целевого соединения находится в данном количестве образца?» (другими словами: «Какова концентрация целевого соединения в образце?»). В хроматографии концентрация вещества в пробе тем больше, чем больше площадь, ограниченная пиком этого вещества на хроматограмме. Другими словами, концентрация вещества в пробе пропорциональна *площади пика* (peak area) этого вещества.

Вообще, время удерживания и площадь пика являются одними из основных параметров пика. По времени удерживания соединения в выбранных условиях проводят идентификацию этого соединения, то есть качественный анализ. Когда соединение идентифицировано, знание площади пика необходимо уже для количественного анализа.

Кроме того, в зависимости от типа применяемого детектора у пика могут быть индивидуальные *спектральные характеристики*, которые значительно облегчают идентификацию соединений и делают ее значитель-

но более надежной. Опять обратимся к примеру с разделением трех красителей. Допустим, необходимо доказать отсутствие в пробе токсичного красного красителя амаранта, который в выбранных условиях должен элюироваться в начале хроматограммы. Мы видим, что на хроматограмме действительно есть пик красного красителя, причем время удерживания очень похоже на ожидаемое для амаранта. Однако всегда есть вероятность, что это пик не амаранта, а другого, неизвестного красного красителя (а их существуют десятки) с практически совпадающим временем удерживания. Выйти из затруднения можно, применяя в качестве детектора не зрение, а фотометр — прибор, позволяющий измерить для соединения его спектр поглощения, к примеру, в видимой области. Сравнив известный спектр поглощения и полученный спектр неизвестного красного красителя, можно выяснить, действительно ли последний является амарантом или нет.

Все параметры пика: время удерживания, спектральные характеристики, площадь пика — неразрывно связаны с условиями, в которых получена хроматограмма. Их можно формально разделить на условия разделения и условия детектирования. Все условия разделения в совокупности: тип адсорбента, габариты хроматографической колонки, состав элюента, скорость подачи элюента (flow rate), температура — называются *хроматографическими параметрами разделения*.

1.2. Жидкостная хроматография

низкого и высокого давления.

Схема жидкостного хроматографа высокого давления

Все приведенные до сих пор примеры касались *жидкостной хроматографии* (liquid chromatography, LC), где подвижной фазой является жидкость. Исторически все основные закономерности хроматографии были исследованы именно на примере жидкостной хроматографии. Эту работу провел российский ученый Михаил Семенович Цвет в начале двадцатого века. Однако, серьезное развитие хроматографических методов последовало лишь в середине прошлого века благодаря работам американских и английских ученых в области *газовой хроматографии* (gas chromatography, GC). Подвижной фазой в газовой хроматографии служит инертный газ: азот, гелий или водород.

Первые установки для проведения экспериментов по жидкостной хроматографии были очень простыми. Фактически, они состояли из одной хроматографической колонки. Поскольку в то время были доступны только адсорбенты с достаточно крупными частицами, элюент мог свободно проходить через слой адсорбента под собственной тяжестью. Таким образом, необхо-

димость использования насоса для подачи элюента под значительным давлением отсутствовала. Поскольку первые эксперименты по разделению проводились на образцах смесей натуральных пигментов (красителей), видимых глазом, то в этом случае можно было обойтись без детектора.

Описанные устройства относятся к *хроматографическим системам низкого давления* (low pressure liquid chromatography, LPLC). Разумеется, современные специализированные системы жидкостной хроматографии под низким давлением могут представлять собой сложные и дорогостоящие приборы. Но их объединяет использование адсорбентов с достаточно крупными частицами, в результате чего давление в таких системах не превышает нескольких атмосфер.

Техника проведения эксперимента по разделению при низком давлении достаточно проста. Можно сказать, что она уже была частично описана в предыдущей главе.

Сначала берут специальную стеклянную трубку (вообще говоря, она называется колонкой, как ни странно) длиной около 20 см и диаметром 1–2 см с пористым стеклянным фильтром на дне и сужающимся горлышком (см. рис. 1.2a). Закрепляют ее на штативе в вертикальном положении. Аккуратно переносят в колонку 5–8 см адсорбционного материала — пористого порошка с зернением (средним диаметром частиц) порядка 100 микрон, то есть 0,1 мм. Колонка готова.

Обычно на такую колонку пробу не наносят в жидком состоянии — поступают несколько иначе. Жидкую пробу смешивают с адсорбентом и с минимальным нагреванием отгоняют растворитель. Высушенный адсорбент с нанесенной пробой переносят в колонку и тонким слоем (0,1–0,5 см) распределяют поверх слоя адсорбента. Смешиванием растворителей готовят необходимый объем элюента. И, наконец, проводят элюирование, время от времени добавляя элюент через верхнюю открытую часть колонки. *Фракции* элюата отбирают в пронумерованные градуированные стаканчики или колбы. Хроматограмму можно построить, измеряя какое-либо свойство каждой из фракций: поглощение света в видимом или ультрафиолетовом (УФ) диапазоне, показатель преломления света, электропроводность (если разделяется смесь ионных соединений), активность (если разделяется смесь ферментов), радиоактивность (если разделяются меченные радиоактивными изотопами соединения) и т.д. Все перечисленные методы относятся к *методам детектирования*. Величина измеряемого свойства откладывается по оси у, номер фракции — по оси х.

Системы низкого давления позволяют работать с большими объемами адсорбента, что является необходимым условием для хроматографического выделения больших количеств целевых веществ высокой чистоты. Хроматография, целью которой является не анализ, а выделение чистых

веществ из содержащих их субстанций, называется *препаративной хроматографией* (preparative chromatography). Колонки для промышленных установок препаративной хроматографии могут достигать 0,5–3 м (!) в диаметре и длины в несколько метров.

Но для целей аналитической химии хроматография низкого давления непригодна. У нее есть существенный недостаток: сравнительно низкая разрешающая способность. Это значит, что хроматографические зоны компонентов получаются очень широкими, и для полного разделения компонентов требуется очень большое различие во времени удерживания. Что на практике, вообще говоря, встречается совсем нечасто. Пример разделения, типичного для хроматографии низкого давления, приведен на рис. 1.2в. Очевидно, что в этом варианте сложно достичь очень хорошего разделения. Кроме того, для элюирования компонентов требуется довольно значительное время.

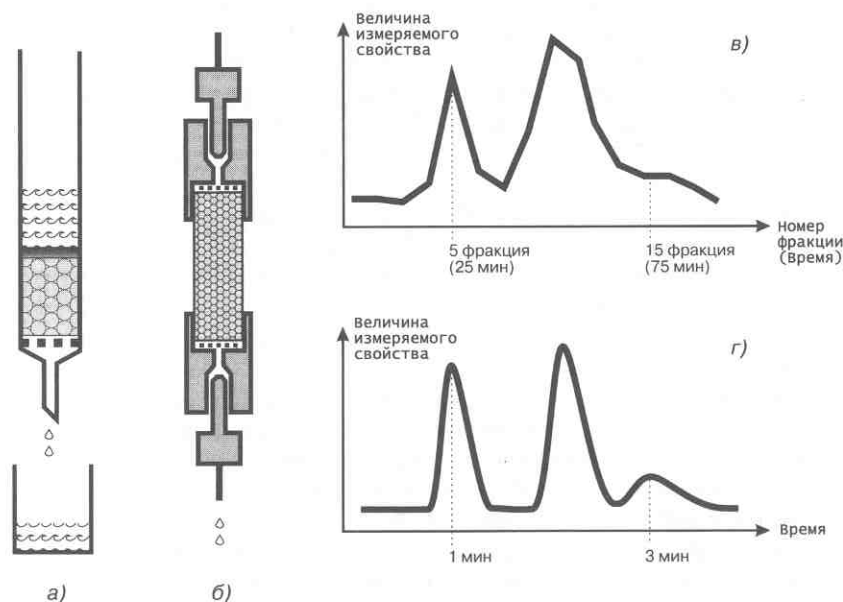


Рис. 1.2. Колонки для хроматографии низкого и высокого давления, а также вид типичных хроматограмм, получаемых на подобных установках: а — колонка для разделения при низком давлении, б — колонка для разделения при высоком давлении, в — типичная хроматограмма разделения трехкомпонентной смеси при низком давлении, г — типичная хроматограмма разделения трехкомпонентной смеси при высоком давлении

Причина невысокой разрешающей способности — применение адсорбентов с крупными частицами. Для того, чтобы жидкостная хроматография могла выполнять задачи аналитической химии, необходимо уменьшить средний диаметр частиц адсорбента по крайней мере до 10 микрон, то есть до 0,01 мм. Подобные адсорбционные материалы стали широко доступны только в начале 70-х годов прошлого века. Переход на новые мелкозернистые адсорбенты повлек за собой революционные изменения в технике для проведения разделений методом жидкостной хроматографии.

Для того, чтобы жидкость (элюент) могла пройти через трубку длиной 15–25 см, плотно упакованную мелким порошком со средним размером частиц 3–5 микрон (то есть колонку для аналитической хроматографии), необходимо создать значительное давление порядка 100–200 атмосфер. Создать такое давление можно лишь при помощи специального и притом достаточно дорогостоящего насоса высокого давления. Жидкостная хроматография высокого давления получила название *высокоэффективная жидкостная хроматография*, ВЭЖХ (high performance liquid chromatography, HPLC). ВЭЖХ широко применяется как один из наиболее универсальных методов физико-химического анализа вещества.

Колонка для ВЭЖХ, заполненная определенным адсорбентом, является, по сути, промышленно выпускаемым изделием. Она представляет собой стальную (как правило) трубку длиной от 5 до 25 см и внутренним диаметром от 2 до 4,6 мм, которая заполнена адсорбентом определенной марки. Колонка симметрична; с каждой стороны на нее устанавливаются пористый фильтр из губчатого титана и съемную (как правило) уплотнительную гайку. Циркулирующая жидкость подводится к колонке и отводится от нее по пластиковым капиллярам, которые закрепляются на концах колонки при помощи специальных уплотнительных винтов — фитингов (см. рис. 1.2б). Типичная для ВЭЖХ хроматограмма приведена на рис. 1.2г. На современных аналитических колонках для жидкостной хроматографии можно полностью разделить до двух-трех десятков компонентов за 10–15 мин.

Но за все хорошее, как известно, надо платить: для проведения разделений методом ВЭЖХ одной колонки уже недостаточно — здесь требуется целый прибор, который называется *жидкостным хроматографом* (liquid chromatograph). Схема самого простого варианта жидкостного хроматографа приведена на рис. 1.3. Как мы уже выяснили, для ВЭЖХ нужен насос высокого давления. Кроме того, для ввода (*инжектирования*) пробы под давлением также необходимо специальное устройство, которое называется *инжектором* (injector). Наконец, аналитический прибор не может обойтись без высокочувствительного *детектора* (detector).

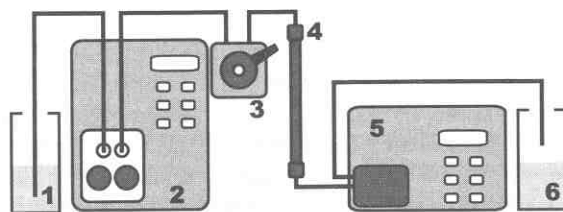


Рис. 1.3. Схема устройства жидкостного хроматографа: 1 — емкость для забора элюента, 2 — насосная система, 3 — система инъекции (ввода пробы), 4 — хроматографическая колонка, 5 — система детектирования, 6 — емкость для слива элюата

Задача детектора состоит в том, чтобы «замечать» самые различные вещества, выходящие из хроматографической колонки, даже в наинизшей концентрации, и количественно отображать сигналы от компонентов разделенной смеси на хроматограмме.

1.3. Как улучшить разделение?

Возможности хроматографии как метода анализа вещества очень сильно зависят от ее способности обеспечивать как можно лучшее разделение сложных смесей на индивидуальные компоненты. От этого зависит правильность анализа или даже вообще возможность проведения определения. И, разумеется, совсем немаловажно время анализа — никому не нужен метод, требующий часы на простейшее определение. Одним словом, каждый хроматографист мечтает (но только в рабочее время) как бы разделить свои образцы получше и поскорее. Процесс улучшения методик разделения называется *оптимизацией* разделения. В этой главе мы начнем обсуждение вопросов оптимизации. Заодно пополним лексикон недостающими терминами. Двигаться будем постепенно, так что советуем запастись терпением.

Подведем некоторые итоги предыдущих двух разделов. Итак, графическим представлением результата разделения является *хроматограмма* — зависимость сигнала детектора от времени элюирования. Хроматограмма начинается в момент ввода пробы и может быть остановлена, в принципе, в любой момент.

Каждое вещество, регистрируемое детектором, отображается на хроматограмме в виде *пика* — зависимости концентрации этого вещества в элюате от времени элюирования. Площадь пика пропорциональна концентрации вещества в пробе; коэффициент пропорциональности зависит как от самого вещества, так и от типа применяемого детектора.

Основной характеристикой вещества в данной хроматографической системе является его *удерживание* в хроматографической колонке, которое может быть выражено несколькими величинами.

Непосредственно из хроматограммы, по положению максимума пика вещества, определяется его *время удерживания* t_R . Объем удерживания (retention volume) V_R равен произведению времени удерживания на объемную скорость подачи подвижной фазы: $V_R = t_R \times v$.

1.3.1. Удерживание. Разрешение

Теперь, если здесь все ясно, будем двигаться дальше. Представьте, что в пробе есть вещество, которое совсем не адсорбируется, то есть совсем не удерживается в выбранных условиях. Оно, надо сказать, не выйдет из колонки сразу в момент старта анализа. Ему надо, пусть даже не задерживаясь, пройти через колонку вместе с элюентом, на что нужно определенное время. Это время называется нулевым (мертвым). Итак, *нулевым временем* t_0 называется время, затрачиваемое полностью несорбируемым веществом на прохождение по хроматографической колонке от узла ввода пробы до кюветы детектора. Нулевое время определяется экспериментально вводом в колонку заведомо неудерживаемого компонента. *Нулевой объем* V_0 при условии пренебрежимо малого объема подводящих капилляров равен объему подвижной фазы внутри хроматографической колонки, то есть около 70% ее общего объема V_C . Нулевой объем определяется как произведение нулевого времени на объемную скорость подачи элюента $V_0 = t_0 \times v$.

Приведенным временем удерживания t'_R называется разница между временем удерживания вещества и нулевым временем $t'_R = t_R - t_0$ (см. рис. 1.4).

Фактором удерживания (retention factor), или, в старой номенклатуре, *фактором емкости* (capacity factor), k' , называется отношение приведенного времени удерживания вещества к нулевому времени $k' = t'_R / t_0$.

Зачем нужны такие сложности? Не проще было бы просто ограничиться одним параметром пика — временем удерживания?

Все дело в том, что время удерживания t_R — это величина, которая измеряется в секундах (минутах, часах), и она строго привязана к габаритам хроматографической колонки и объемной скорости подачи подвижной фазы. Фактор емкости k' никак от них не зависит. Эта безразмерная величина является мерой удерживания данного вещества на данном адсорбенте при применении данного элюента. И если для целей аналитической химии нам будет вполне достаточно знать t_R , то для сравнения разных результатов на разных колонках мы будем пользоваться исключительно величинами k' .

Для современных аналитических колонок размера 250 × 4,6 (длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм) при скорости подачи элюента

1 мл/мин нулевое время составляет величину порядка $t_0 \approx 2,5$ мин, а оптимальное время элюирования целевых соединений $2 < k' < 5$ изменяется от 7,5 до 15 мин.

Фактор емкости пика с точностью до постоянного для каждой хроматографической колонки множителя равен константе адсорбции вещества в хроматографической системе (строго говоря, при условии предельно низкой концентрации вещества в пробе, то есть в области линейности изотермы адсорбции):

$$K = (V_0 / (V_C - V_0)) \times k',$$

где K — константа адсорбции вещества в хроматографической системе, k' — фактор емкости пика, V_C — общий объем колонки, V_0 — нулевой объем.

Задачей хроматографии является разделение веществ за счет разности в их удерживании. Степень разделения двух веществ называется *разрешением*

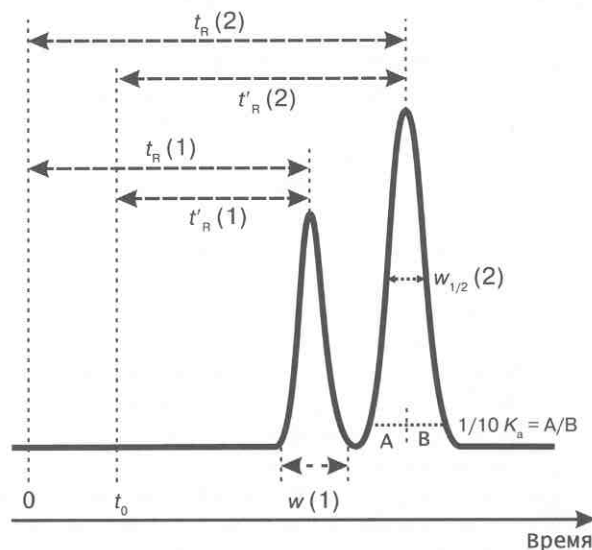


Рис. 1.4. Основные параметры, непосредственно выделяемые из хроматограммы:

- t_0 — нулевое время;
- $t_R(1)$ — время удерживания для первого пика;
- $t'_R(1)$ — исправленное время удерживания для первого пика;
- $w(1)$ — ширина первого пика у основания;
- $w_{1/2}(2)$ — ширина второго пика на половине его высоты

(resolution). Непосредственно из хроматограммы разрешение двух пиков вычисляется как отношение разницы во временах удерживания к половине суммы ширин пиков на уровне базовой линии:

$$R = 2 \times (t_R(1) - t_R(2)) / (w(1) + w(2)).$$

Если вещества не разделяются, то разрешение равно нулю. При разрешении, равном единице, перекрываются лишь порядка 2% площадей двух пиков. Именно такая ситуация изображена на рис. 1.4. Можно считать, что при $R \geq 1$ пики разделяются «до базовой линии» (baseline separation). Базовой линией (baseline) называется линия фонового сигнала детектора. Базовая линия прописывается на хроматограмме, когда никакие компоненты не элюируются с колонки.

Термин «разрешение» нужен для того, чтобы выразить степень разделения двух пиков количественно: мы знаем, как рассчитать эту величину, держа хроматограмму перед глазами.

Теперь можно перейти к самому главному — к вопросу, какие факторы оказывают влияние на разрешение. Назову их сразу: это селективность, эффективность, а также удерживание (с последним мы уже знакомы).

1.3.2. Селективность — параметр, отражающий физико-химические взаимодействия в хроматографической системе

Величина, отражающая способность хроматографической системы к разделению веществ, называется *селективностью* (selectivity) системы по отношению к этим веществам. «Селективность» в переводе означает «избирательность».

Для двух пиков селективность можно вычислить непосредственно из хроматограммы как отношение фактора удерживания более удерживаемого пика к фактору удерживания менее удерживаемого: $\alpha = k'_2 / k'_1$. При $\alpha = 1$ (полное отсутствие избирательности хроматографической системы) разделение не происходит. Более того, его невозможно добиться применением более качественной хроматографической колонки или любым другим способом, кроме как изменить саму хроматографическую систему: подвижную и/или неподвижную фазу. Разделение на данном адсорбенте при применении данного элюента принципиально возможно, только если $\alpha > 1$.

Есть такая характеристика разделения как сложность разделения — пока я могу лишь посоветовать воспринять ее интуитивно. Так вот, сложность разделения очень быстро уменьшается с ростом селективности. Таким образом, селективность является ключевым фактором, влияющим на разрешение. Управление селективностью — это искусство подбора опти-

мального адсорбента и оптимального элюента для данного разделения. Этому искусству нужно учиться.

Одним из преимуществ жидкостной хроматографии является возможность улучшения селективности без замены неподвижной фазы, путем грамотного изменения состава подвижной фазы и соотношения ее компонентов. Это свойство жидкостных хроматографических систем называется *гибкостью* (flexibility).

Термин «селективность» может также применяться в более общем значении — как свойство хроматографической системы успешно справиться с разделением сложного многокомпонентного объекта. Так, хроматограмма из n пиков характеризуется $1/2n(n-1)$ частными значениями селективности α . Но, понимая селективность как общее свойство хроматографической системы, этим термином можно назвать всю совокупность значений α .

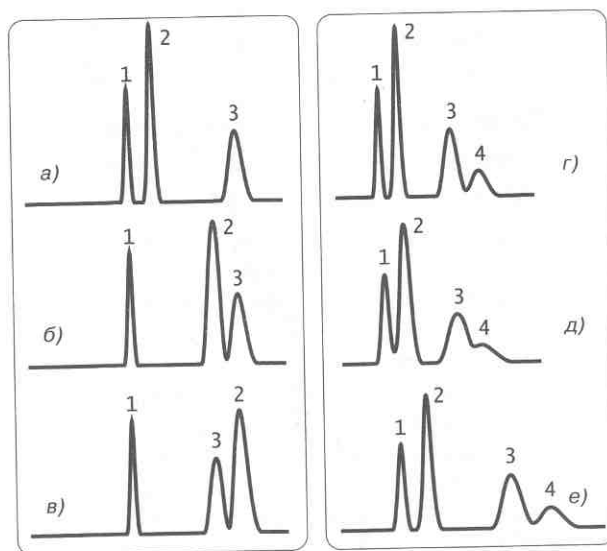


Рис. 1.5. Разделения с различной и одинаковой селективностью: а, б, в — разделение трехкомпонентной смеси в системах с различной селективностью: б — селективность отлична от а), но порядок элюирования сохраняется, в — селективность отлична от а), причем изменяется и сам порядок элюирования; г, д, е — разделения четырехкомпонентной смеси в системах с одинаковой селективностью: д — при отличной от г) эффективности, е — при отличном от г) удерживании

В этом случае «селективность» подразумевает типичный для данной хроматографической системы порядок элюирования компонентов. При постоянной селективности хроматограмма всегда выглядит одинаково: пики могут быть шире или уже, анализ может занимать разное время, но последовательность элюирования, пропорции между факторами удерживания компонентов будут также всегда оставаться постоянными (см. рис. 1.5г, д, е).

Селективность данной хроматографической системы является суммарной характеристикой физико-химических взаимодействий в хроматографической системе: вещества с адсорбентом, вещества с элюентом и элюента с адсорбентом. Для изменения селективности надо либо заменить применяемый адсорбент, либо поменять состав элюента. Селективность также зависит от температуры, при которой проводится разделение.

1.3.3. Эффективность хроматографической колонки.

Пиковая плотность. Асимметрия пика

Помимо других факторов, разрешение пиков зависит от того, насколько сильно размываются хроматографические зоны веществ при продвижении вдоль колонки. Чем сильнее их размывание, тем шире оказываются пики (при условии, что их времена удерживания не изменяются), и тем хуже они разрешаются.

Величина размывания хроматографической зоны определяется характеристикой, которая называется *эффективностью*. Чем выше эффективность, тем уже хроматографическая зона. Эффективность целиком и полностью является свойством хроматографической колонки и определяется: размером частиц адсорбента, качеством изготовления адсорбента, качеством упаковки колонки адсорбентом и т.д. На рис. 1.6а, б показаны хроматограммы с одинаковым удерживанием компонентов и селективностью, но различной эффективностью (на 1.6б эффективность ниже). Конечно же, на колонках с высокой эффективностью разрешения выше.

Эффективность можно вычислить по любому пику на хроматограмме:

$$N = 5,545 \times (t_R / w_{1/2})^2,$$

где N — эффективность, $w_{1/2}$ — ширина пика на половине высоты, мин, t_R — время удерживания, мин.

Это вычисление основано на предположении, что форма пика описывается кривой Гаусса, то есть кривой нормального распределения случайной величины.

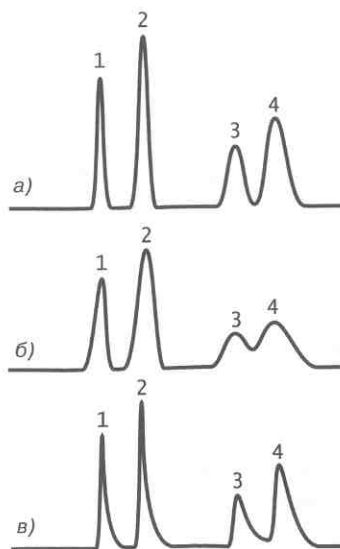


Рис. 1.6. Разделение трехкомпонентной смеси с варьируемой эффективностью или асимметрией: б — эффективность ниже, чем в случае а); в — эффективность одинакова с а), но асимметрия пиков значительно выше

Вообще говоря, эффективность — это безразмерная величина, но в хроматографии принято приписывать ей единицу измерения с довольно экзотическим названием: количеством теоретических тарелок, т.т. (plate number). Когда речь идет об аналитических применениях, любят характеризовать колонку именно эффективностью (количеством теоретических тарелок). Когда же речь заходит о теории хроматографии, то пользоваться предпочитают обратной ей величиной, которая называется *высотой, эквивалентной теоретической тарелке, ВЭТТ* (height equivalent to theoretical plate, HETP, H):

$$H = L/N,$$

где H — ВЭТТ, мм, L — длина колонки, мм, N — эффективность колонки, т.т.

Хотя величина эффективности определяется только хроматографической колонкой, ее конкретное значение зависит от скорости подачи элюента, а также немного от температуры системы и адсорбата, по пику которого проводится расчет. Поэтому *тестирование* колонки (определение эффективности) проводится при общепринятой скорости подвижной фазы (1 мл/мин для колонок с диаметром 4,6 мм) и по определенным адсорбатам (к примеру, по толуолу или нафталину). Зависимость эффективности (точнее, ВЭТТ) от скорости подвижной фазы называется зависимостью Ван-Деемтера; она обсуждается в гл. 4.

Эффективность хроматографической колонки в первом приближении пропорциональна ее длине; таким образом, при оценке качества упако-

ки колонки адсорбентом принято использовать значение удельной эффективности, то есть эффективности, отнесенной к единице длины. Для современных высокоэффективных колонок значения удельной эффективности лежат в интервале 80–230 тысяч теоретических тарелок на метр.

Выше мы описывали пик «колоколообразной», симметричной формой кривой Гаусса. На практике, однако, пики бывают разными, в том числе асимметричными. Коэффициент асимметрии K_a вычисляется как отношение «правой» полуширины пика к «левой» на одной десятой его высоты (см. рис. 1.4). При одинаковой эффективности асимметричные пики разрешаются хуже (см. рис. 1.6а, в). Таким образом, асимметричность пиков является нежелательным явлением, с которым хроматографисты и производители колонок активно борются.

Неудобство применения эффективности как величины для оценки разрешающей способности колонки связано с тем, что разрешение, как будет показано далее, пропорционально не прямо эффективности, а квадратному корню из нее. Вероятно, более удобна в этом отношении другая величина, которая называется *пиковой плотностью* (peak capacity). Она определяется как число пиков, которые могут быть расположены на хроматограмме (до произвольно выбранного k') друг за другом с разрешением, равном единице. Пиковая плотность связана с эффективностью колонки:

$$n = 1 + 0,6 \times \sqrt{N \times \lg(1 + k')},$$

где n — пиковая плотность, N — эффективность, k' — фактор удерживания последнего компонента.

1.3.4. Связь разрешения с селективностью, эффективностью и фактором удерживания (основная формула хроматографии)

Подведем итоги. Есть три фактора, влияющих на разрешение двух пиков: селективность хроматографической системы, эффективность колонки и величина удерживания данных двух веществ.

Самым важным фактором является селективность системы α . Изменить ее не так-то просто — часто для этого нужно либо заменить неподвижную фазу (выбрать колонку с другой маркой адсорбента), либо серьезно изменить состав элюента (не просто изменить соотношение смешиваемых растворителей, а, например, заменить один растворитель на другой). Тем более непросто ее не ухудшить, а улучшить, причем целенаправленно — для этого необходимо хорошее знание хроматографических закономер-

ностей. Но дело того стоит: ведь даже небольшой рост селективности приводит к серьезному улучшению разрешения.

Вторым по значимости фактором является эффективность колонки N . Увеличить эффективность достаточно просто — необходимо взять более эффективную колонку — но у этого подхода есть свои ограничения, подробно обсуждаемые в разд. 4.3.

Наименее значимый эффект на разрешение оказывает величина удерживания k' . Только для наименее удерживаемых компонентов с $k' < 2$ увеличение удерживания приводит к видимому улучшению разрешения. При k' порядка 3–5 уже можно считать, что удерживание практически никак не сказывается на разрешении. Из этого надо сделать всего один вывод: удерживание целевых соединений (аналитов) по возможности не должно быть менее $k' = 2$.

Эти эмпирические правила просто выражаются количественно. Формулу, связывающую разрешение R со значениями α , N и k' , иногда называют основной формулой хроматографии:

$$R = 1/4 \times (\alpha - 1) / \alpha \times \sqrt{N \times k'_2 / (k'_2 + 1)},$$

где R — разрешение, α — селективность, N — эффективность, k'_2 — фактор удерживания второго пика.

Для каждого конкретного случая можно назвать свой наиболее оптимальный путь улучшения разделения. Если плохое разрешение — следствие слишком слабого удерживания (см. рис. 1.7а), то удерживание следует немного увеличить (см. рис. 1.7б). Но не слишком: разрешение останется практически неизменным, а вот время анализа сильно возрастет (см. рис. 1.7в).

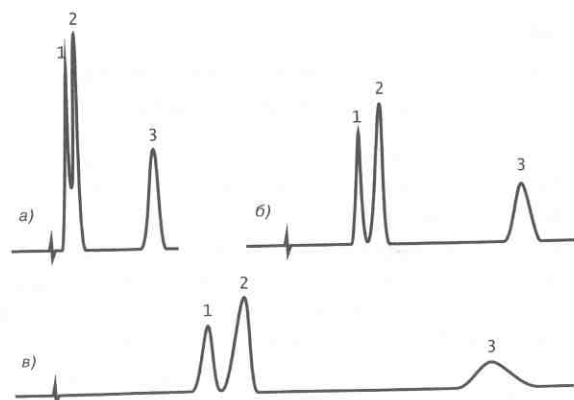


Рис. 1.7. Разделение при увеличении удерживания k'

На хроматограмме, приведенной на рис. 1.8а, недостаточное разрешение связано, очевидно, с низкой эффективностью, поскольку и с удерживанием, и с селективностью проблем нет. То есть, надо взять более эффективную колонку (см. рис. 1.8б).

Конечно же, если при хороших эффективности и удерживании на хроматограмме все равно есть критические пары (см. рис. 1.9а), то улучшить ситуацию можно, лишь изменив селективность (см. рис. 1.9б).

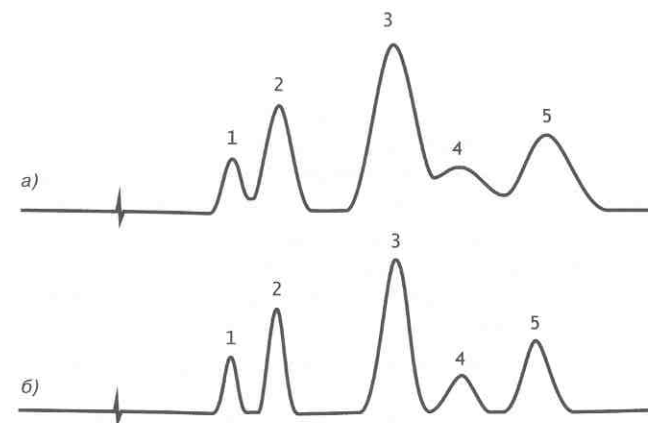


Рис. 1.8. Разделение при увеличении эффективности N

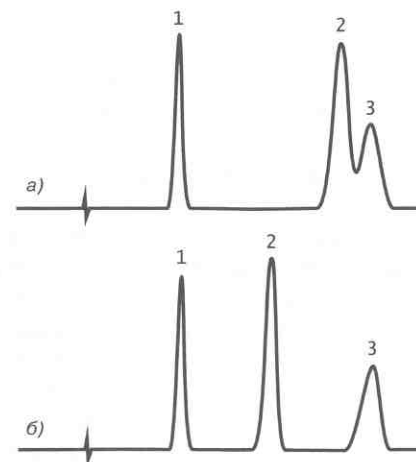


Рис. 1.9. Разделение при улучшении селективности α

ГЛАВА 2

НАЧИНАЕМ РАБОТАТЬ НА ЖИДКОСТНОМ ХРОМАТОГРАФЕ

Освоение жидкостного хроматографа, как и любого аналитического прибора, очень часто начинается с работы по четко заданной методике. Первый раз методика устанавливается сторонним специалистом, например, сервис-инженером той фирмы, которая поставила хроматограф. Это неплохой старт, поскольку у начинающего специалиста всегда есть время просто привыкнуть к манипуляциям с прибором и программой, не слишком задумываясь о том, что за колонка установлена на приборе и почему используется именно этот элюент. Пики разделяются, программа их обчитывает — и замечательно.

На следующем этапе руководство лаборатории, удостоверившись в том, что процесс идет, дает задание внедрить и другие методики определения. Методики ищут, причем разными путями — в статьях, Интернете или спрашивают у знакомых. Пытаются их применить, и не всегда успешно. Не всегда условия разделения можно скопировать точно. К примеру, марка адсорбента или габариты колонки, которые есть в наличии, могут отличаться от указанных в методике. Определенный растворитель может быть недоступен, но доступен какой-либо другой и т.д. Паниковать не стоит. Если найденная методика изначально работает, то с селективностью проблем, наверное, не возникнет.

Но зато наверняка придется отрегулировать удерживание. Ведь если пики «вылетают» очень быстро, они не успевают разделиться. А если они выходят в течение неоправданно большого времени, то теряется производительность анализа. Одним словом, регулирование времени удерживания — это самая простая задача оптимизации анализа, и ее надо освоить в первую очередь. Как раз этому вопросу посвящен разд. 2.1.

При отклонении от проторенных дорожек у начинающего специалиста неизбежно начнутся сложности с прибором. И причина будет заключаться не в приборе как таковом, а в отсутствии знаний по правильной эксплуатации хроматографа. По статистике, до 90% всех обращений в сервисные службы фирм-поставщиков связаны именно с такими ситуация-

ми. Опять же, при возникновении проблемы паниковать не стоит. В решении проблем, связанных с эксплуатацией прибора, поможет понимание устройства блоков хроматографа и знание их «узких мест». Эти сведения приведены в разд. 2.2.

В разд. 2.3—2.5 приведена целая подборка небольших технических тонкостей, знание которых способно серьезно облегчить жизнь аналитика на начальных этапах самостоятельной работы на жидкостном хроматографе.

2.1. Как управлять временем удерживания?

Этот, казалось бы, простой вопрос требует объяснения не на одну страницу. Действительно — удерживание не регулируется тумблером на панели прибора. Для изменения удерживания необходимо изменить соотношение компонентов элюента. Так что уже на этом этапе без знаний основ химии не обойтись.

Также на этом пути было бы не лишним запастись терпением и долей пространственного воображения, ведь для хорошего понимания придется представить себе, что происходит внутри колонки!

2.1.1. Полярность. Полярные и неполярные растворители и адсорбенты

Предлагаю начать наш химический экскурс с обзора растворителей, которые чаще всего применяются в хроматографии для приготовления элюентов. Чтобы как-то отличать их друг от друга, сразу припишем каждому растворителю свойство *полярности* (polarity). Думаю, сейчас вполне достаточно воспринять его суть интуитивно: нечто, обладающее высокой полярностью, хорошо растворяется в воде, а обладающее низкой полярностью — в жире, бензине и т.д. Все, кто имел дело с масляной краской, меня хорошо поймут. Руки, запачканные в краске, водой не ототрешь никак. Слегка лучше спиртом, но на самом деле надо брать олифу, скипидар, бензин — то есть углеводороды. А вот рубашку с пятном от сока клюквы надо срочно промывать водой и ничем другим. Все это потому, что масляная краска, скипидар, бензин — неполярные вещества, а красители клюквы, вода, спирт — полярные. Неполярное отмывается неполярным, а полярное полярным — все логично.

Как мы потом увидим, хроматография вообще имеет очень забавное сходство со стиркой, и к этой аналогии мы еще вернемся.

Итак, в хроматографии применяется целый ряд растворителей различной полярности. Самый полярный из привычных растворителей — это вода.

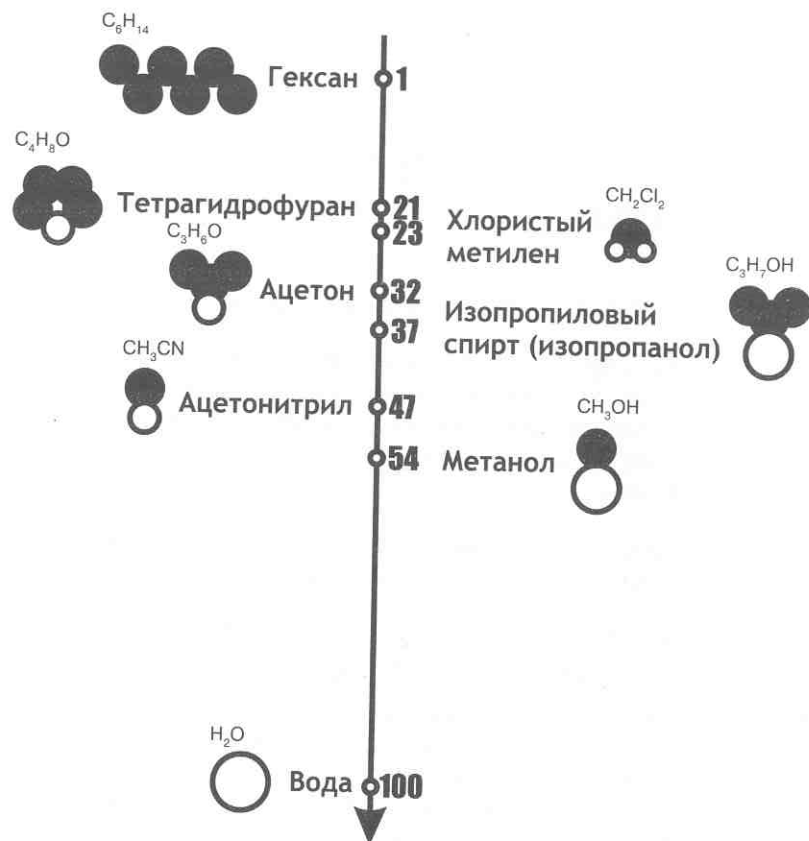


Рис. 2.1. Ряд полярности растворителей, применяемых в жидкостной хроматографии

Самый неполярный — гексан (один из компонентов бензина). Где-то посередине между ними — ацетон и изопропиловый спирт, которые могут неограниченно смешиваться и с гексаном, и с водой (см. рис. 2.1).

Свойством полярности обладают и адсорбенты — впрочем, как и любой материал. Капните воду на сковороду с тефлоновым покрытием — вода сожмется в плотный шарик. Это потому, что она не смачивает поверхность, не хочет с ней хорошо взаимодействовать. Вода полярная, а тефлон — нет. То есть, если сделать из тефлона адсорбент — он будет неполярным. Кстати, это не шутка — адсорбенты из тефлона широко применяются в газовой хроматографии.

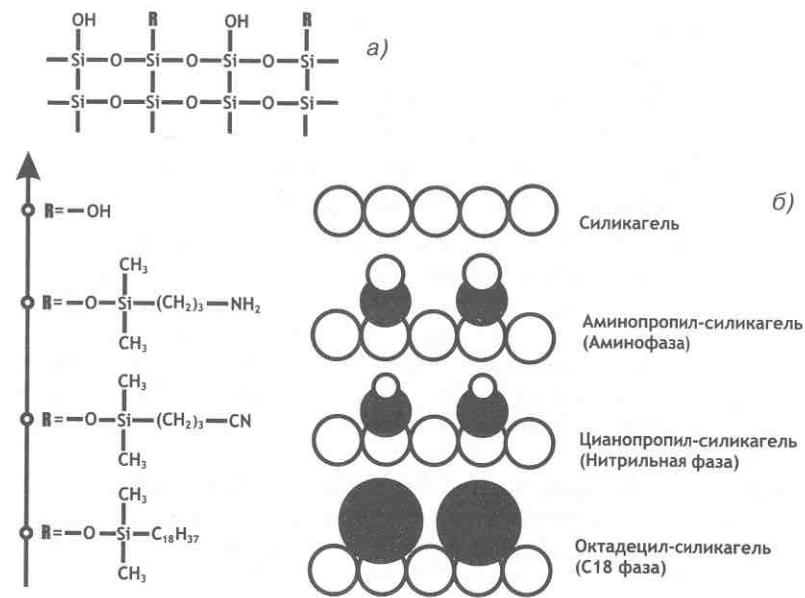


Рис. 2.2. Адсорбенты, применяемые в жидкостной хроматографии

А вот со стеклом — наоборот. Вода растечется по стеклу тонким слоем. Вода полярная и стекло полярное — они активно взаимодействуют. Адсорбент из стекла тоже будет полярным.

И, кстати, это тоже не шутка. Даже более того, «стеклянные» адсорбенты — самые широко применяемые в жидкостной хроматографии. Они называются *силикагелями* (silica gel). Вообще говоря, они имеют структуру не стекла, а кварца, то есть песка — но здесь, наверное, это можно считать уже тонкостями. Раньше силикагель получался осаждением геля кремниевой кислоты щелочью из водного раствора силикатов. Полученный гель высушивался — и в результате получали порошок силикагеля, обладающий высокой пористостью, порядка 600 м² на грамм адсорбента. Современный способ синтеза силикагеля немного другой, но не в этом суть.

Главное то, что на основе силикагеля путем проведения химических реакций (*химического модифицирования*) промышленно получают широкий спектр адсорбентов самой разной полярности — от полярных амино-силикагеля и циано-силикагеля до неполярного C18 (читается «це восемнадцать»), или октадецил-силикагеля (см. рис. 2.2). Неполярный C18 силикагель фактически представляет собой силикагель, покрытый C18 углеводородом, то есть тончайшей прочной пленкой машинного масла!

2.1.2. Как происходит удерживание. Что значит «нормальная фаза» и «обращенная фаза»? Элюирующая сила растворителя. Применение для элюирования смесей растворителей различной полярности. Компоненты элюента: основа, добавка и модификатор

В газовой хроматографии удерживание вещества на адсорбенте определяется исключительно взаимодействием этого вещества и адсорбента. Допустим, вещество неполярное и адсорбент неполярный — сразу понятно, что они будут сильно взаимодействовать и удерживание будет большим. К примеру, если адсорбент — это пористая сажа, а адсорбат — любой углеводород (тот же гексан), то, чтобы пик гексана вышел из колонки, надо обеспечить температуру колонки в двести-триста градусов, не меньше.

В жидкостной хроматографии все немного сложнее. Адсорбат взаимодействует и с адсорбентом, и с элюентом. В результате, удерживание определяется разностью двух взаимодействий (см. рис. 2.3).

Жидкостная хроматография

$$\text{Удерживание} = \text{Взаимодействие "Адсорбат-Адсорбент"} \text{ минус } \text{Взаимодействие "Адсорбат-Элюент"}$$

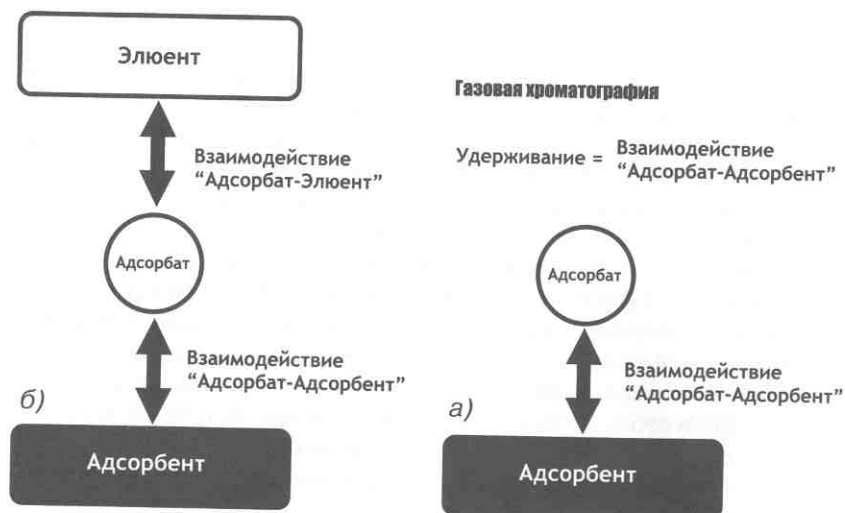


Рис. 2.3. Схема взаимодействий в жидкостной системе

Поэтому гексан ни за что не смывает с пористой сажи водой, пусть даже горячей: его «не тянет» в воду — ведь она полярная, в отличие от «родной» неполярной сажи. Вот зато изооктаном или другим углеводородом гексан смывается с сажи без проблем даже при комнатной температуре. Это становится возможным потому, что гексану примерно «все равно», где находится — в неполярной неподвижной фазе (саже) или в неполярной же подвижной (изооктане). А это значит, что он будет неумолимо двигаться вдоль колонки, пока не элюируется в виде пика. Вот что значит «правильная» подвижная фаза — все начинает элюироваться без всякого повышения температуры.

Мораль такова: в жидкостной хроматографии мы всегда можем компенсировать взаимодействие «адсорбат-адсорбент» другим взаимодействием «адсорбат-элюент». Причем ровно в такой мере, в которой нам необходимо для приемлемого удерживания целевого соединения. Именно так осуществляется регулирование времени удерживания в жидкостной хроматографии — путем подбора состава элюента, при котором достигается хороший баланс двух сил, двух взаимодействий.

Хроматографисты шутливо называют этот принцип «поддержать и отпустить». Правильно подобранный элюент не должен ни резко смывать вещество с адсорбента, ни оставлять его на адсорбенте. Все должно смываться, но постепенно.

Теперь — еще один мысленный эксперимент (но не последний в этой главе — потерпите!). Представим, что молекула любого вещества (адсорбата) состоит из двух частичек — полностью неполярной (черного цвета) и полностью полярной (белого цвета). То есть получается такая несимметричная черно-белая гантелька. У более полярных веществ белая долька больше, а черная меньше, а у более неполярных — наоборот. Идем дальше. Допустим, у нас есть абсолютно неполярный адсорбент (черная поверхность) и абсолютно полярный адсорбент (белая поверхность). Если запустить смесь разных молекул-гантелек рядом с поверхностью-адсорбентом, то они будут притягиваться к ней. Белые дольки будут «липнуть» к белой поверхности, а черные дольки — к черной поверхности.

В результате реального хроматографирования на полярном, «белом» адсорбенте мы увидим, что пики разделяемых веществ выходят в порядке увеличения их полярных, «белых» долек. При хроматографировании на неполярном, «черном» адсорбенте мы увидим, что пики веществ выходят в порядке увеличения их неполярных, «черных» долек. И не надо думать, что эти последовательности будут копировать друг друга с точностью до наоборот. Нет, большая черная долька у молекулы совершенно не означает, что белая будет маленькой! Все может быть как угодно. В общем случае, мы получим две совершенно различные последовательности элюирования.

Хроматографическая система, основанная на «белом», полярном адсорбенте, называется *нормально-фазовой*, *НФ* (normal-phase, NP), а основанная на «черном», неполярном — *обращенно-фазовой*, *ОФ* (reversed-phase, RP). Почему такие странные названия? Ну, наверное, потому, что вначале пользовались в основном полярными адсорбентами, и это казалось нормальным. А неполярными стали пользоваться позже. Там с непривычки все казалось каким-то странным и вывернутым наизнанку — обращенным. Названия переделывать было лень, поэтому они закрепились. Мы еще не раз будем сталкиваться с подобными необычными названиями.

Наконец, мы можем переходить от теории к суровой практике. Для начала выясним: какие смеси растворителей применяют для приготовления элюентов в нормально-фазовой, а какие — в обращенно-фазовой хроматографии?

Начнем с обращенной фазы, здесь объяснение будет попроще. Помните руки, запачканные масляной краской? Если да, то хорошо. Теперь будет примерно то же самое, но руки будут запачканы разными маркерами, то есть маркерами разных цветов. Вот это и есть наша мысленная обращенно-фазовая колонка с неполярным адсорбентом, на которой разделяют смесь красителей.

Если попытаемся отмыть руки водой — ничего не получится (аналиты не элюируются). Возьмем спирт — все мгновенно ототрется (все пики, не разделившись, «вылетают» в нулевое время). Теперь надо вспомнить принцип «подержать и отпустить»: в хорошей хроматографии все должно смываться, но постепенно. Добавим в воду немного спирта и начнем оттирать маркер с рук. Сначала, допустим, «поплывет» красный краситель, потом синий, потом зеленый. По аналогии, это будет соответствовать получению трехкомпонентной хроматограммы из разд. 1.1. То есть, чтобы добиться подходящих условий хроматографирования, приемлемых времен удерживания, нам пришлось смешать два растворителя — воду и спирт.

Этого примера вполне достаточно, чтобы пополнить наш лексикон порцией новых терминов. Основной компонент элюента (растворитель) будем называть *основой*. Второй, дополнительный компонент элюента будем называть *добавкой*.

В приведенном выше примере основой элюента была вода, а добавкой — спирт. В обращенно-фазовой хроматографии основа — это всегда более полярный растворитель, чем добавка. То есть мы можем говорить о полярной основе и неполярной добавке (см. рис. 2.4). Поскольку на обращенной фазе вещества разделяются по величине «черной», неполярной половинки, то увеличение доли неполярной добавки в элюенте приводит к увеличению взаимодействия «адсорбат-элюент». Что фактически означает уменьшение удерживания всех веществ в системе.



Рис. 2.4. Схема приповерхностного слоя в обращенно-фазовой системе

Итак, в обращенно-фазовой хроматографии адсорбент неполярный; элюент имеет в основе полярный растворитель, который смешивается в подходящей пропорции с неполярной добавкой. Чем больше в элюенте доля неполярной добавки, тем меньше удерживание.

Самый распространенный тип адсорбента для ОФ ВЭЖХ — это C18 силикагель. Самая распространенная основа элюента — вода или водно-солевой буфер. В качестве неполярной добавки часто применяется ацетонитрил и метанол, реже — тетрагидрофуран или изопропиловый спирт, обладающие высокой элюирующей силой.

Теперь небольшое «лирическое отступление». Очевидно, что добавка всегда имеет большую *элюирующую силу*, чем основа. Органические растворители, используемые в качестве добавок, можно расположить в ряд по возрастанию их элюирующей силы. Такой ряд называется *элюотропным рядом*. Элюотропные ряды для обращенно-фазового и нормально-фазового режимов различны, если не сказать — противоположны. На рис. 2.1 элюирующая сила для нормально-фазовой хроматографии растет «сверху

вниз», в порядке увеличения полярности растворителя. Для обращенно-фазовой хроматографии все обстоит наоборот: в грубом приближении, элюирующая сила растет «снизу вверх», по мере уменьшения полярности растворителя.

Теперь о нормально-фазовой хроматографии. Если говорить очень поверхностно, то здесь все обстоит наоборот относительно ОФ варианта. Основа — это менее полярный растворитель, чем добавка. Добавка на этот раз называется *полярной добавкой*. Удерживание веществ тем меньше, чем выше доля полярной добавки в элюенте. Наиболее распространенным полярным адсорбентом для НФ ВЭЖХ является силикагель.

Дальше — сложнее. Нормально-фазовые системы разделяются на «классические» нормально-фазовые и *гидрофильные* (HILIC, hydrophilic interaction chromatography). Начнем с «классической» нормально-фазовой хроматографии. Классика — это, образно говоря, белая рубашка с желтым пятном от одеколона. Рубашка состоит из целлюлозы (я не очень уважаю синтетику), то есть аналог полярного адсорбента. Пигменты одеколона — вещества средней полярности. Смыть пятно водой не получится хотя бы потому, что в воде эти вещества даже не растворяются. Нет, здесь максимально полярный растворитель, который имеет смысл применять, это тот же спирт. Он вычистит пятно моментально. Чтобы в лучших хроматографических традициях пятно чистилось подольше, надо немного спирта (полярная добавка) смешать, например, с гексаном (неполярная основа). Надеюсь, здесь все ясно.

Вообще, основой элюента в «классической» нормально-фазовой хроматографии, как правило, является именно гексан. В качестве полярной добавки можно применять множество растворителей: простые эфиры (диоксан, тетрагидрофуран), сложные эфиры (этилацетат), алкилхлориды (хлороформ, хлористый метилен), кетоны (ацетон), часто спирты (особенно изопропиловый спирт, который неограниченно смешивается с гексаном).

Элюирующая сила растворителя для нормально-фазовой хроматографии, если посмотреть на рис. 2.1, растет «сверху вниз», то есть чем больше полярность растворителя, тем больше его элюирующая сила. Растворители до спиртов включительно применяются в «классике» НФ ВЭЖХ в качестве полярных добавок.

Растворители максимальной элюирующей силы: вода, уксусная кислота, триэтиламин (ТЭА) — являются *модификаторами*. Термин «модификатор» означает, что данный растворитель даже при его очень малой концентрации в элюенте способен значительно модифицировать, изменять структуру поверхности адсорбента и таким образом значительно влиять на его свойства. В «классическом» варианте концентрация модификатора может изменяться от сотых долей процента до нескольких процентов.



Рис. 2.5. Схема приповерхностного слоя в нормально-фазовой системе

Молекулы модификатора образуют на поверхности полярного адсорбента *адсорбционный слой*, который в «классике» является мономолекулярным (см. рис. 2.5). Самым распространенным модификатором в НФ ВЭЖХ является уксусная кислота.

Что произойдет, если оставить элюент для нормальной фазы двухкомпонентным, то есть формально обойтись без модификатора? Дело в том, что в реальности в применяемых растворителях всегда есть влага, вода. Само по себе это ни плохо, ни хорошо. Зато это однозначно плохо тем, что концентрацию остаточной влаги невозможно полностью контролировать. В результате, полярность силикагеля (часто ее называют *активностью*) неконтролируемо уменьшается, как и времена элюирования веществ в подобных двухкомпонентных системах (говорят, что времена удерживания «плывут»). Для стабилизации удерживания в элюент как раз и добавляют модификатор, к примеру, 1% уксусной кислоты. Здесь срабатывает принцип «клин клином вышибают»: уксусная кислота вытесняет влагу из адсорбционного слоя и минимизирует ее влияние на удерживание.

Тройные элюенты применяют в НФ хроматографии; для твердофазной экстракции чаще пользуются двухкомпонентными элюентами «основа-полярная добавка». Это связано с тем, что адсорбционные картриджи или колонки с силикагелем, окисью алюминия, флоризилом или другими неорганическими адсорбентами используются только один раз. Каждый раз для проведения новой твердофазной экстракции берут свежую порцию полярного адсорбента. Строго определенная, неизменная активность «свежих» полярных адсорбентов обеспечивается хорошо разработанными процедурами их предварительной термической обработки и хранения.

Теперь перейдем к гидрофильной хроматографии. По аналогии, здесь на белую рубашку посадили пятно не какого-то одеколона, а клюквы или травы. Основное отличие от предыдущего случая — природные пигменты имеют очень высокую полярность. Спиртом такое пятно не ототрешь. Его можно смыть водой. Постепенно такое пятно отмывается смесью полярного органического растворителя и воды.

Таким образом, гидрофильная хроматография — это нормально-фазовая хроматография, но с гораздо более полярным элюентом для разделения чрезвычайно полярных веществ, многие из которых имеют природное происхождение. Основой элюента практически всегда является ацетонитрил, а полярной добавкой и модификатором одновременно — вода или водно-солевой буфер. Чем больше в элюенте воды, тем меньше удерживание; однако доля воды в элюенте редко превышает 20–30%.

Структура адсорбционного слоя в гидрофильной хроматографии — полимолекулярный слой, то есть на поверхности адсорбента образуется тонкая пленка воды.

Гидрофильную хроматографию с большой долей уверенности можно считать антиподом обращенно-фазовой хроматографии. Особенно хорошо это заметно на примере разделения любых гликозидов, веществ, состоящих из большой неполярной половинки, аглика, и большой полярной половинки, сахарного остатка. Такие вещества отлично удерживаются и в ОФ, и в гидрофильных НФ системах. Причем, что самое главное, порядок элюирования в них очень часто получается строго обратным.

2.1.3. Зависимость удерживания от состава элюента.

Уравнение Скотта

Очень удобным количественным выражением зависимости удерживания от состава элюента, а точнее от доли добавки в его основе, является уравнение Скотта:

МС-АНАЛИТИКА

TEXTRONICA AG

www.textronica.com

+7 (495) 995 88 90

+7 (495) 937 96 33



Центральный, Южный, Северо-Кавказский ФО: компания «ИнтерАналит»
тел.: (495) 221-19-61, e-mail: info@analit.ru

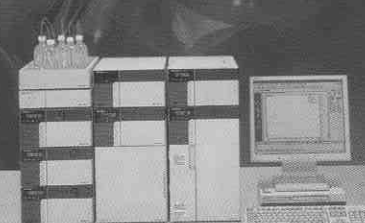
Северо-Западный, Приволжский ФО: компания «АНАЛИТ»
тел.: (812) 325-55-02, e-mail: info@analit-spb.ru

Уральский, Сибирский ФО: компания «ЭЛЕМЕНТ»
тел.: (343) 278-34-64, e-mail: element@element.utk.ru

Дальневосточный ФО: Представительство
Шимадзу во Владивостоке
тел.: (4232) 266-651, e-mail: svl@shimadzu.ru

Представительство Шимадзу в Москве
тел.: (495) 941-81-16, e-mail: smo@shimadzu.ru

Представительство Шимадзу в СПб
тел.: (812) 325-72-61, e-mail: spo@shimadzu.ru



www.shimadzu.ru

LC-20 Prominence — современное мощное модульное хроматографическое оборудование, которое позволяет создавать ВЭЖХ-системы, оптимизированные под конкретные задачи, какими бы сложными они ни были.

Серия LC-20 включает несколько систем, сконфигурированных под определенные аналитические задачи:

- система LC-20A Prominence,
- система LC-20 для ионной хроматографии,
- системы LC-20 micro и nano,
- система для быстрой ВЭЖХ — LC-20 UFLC,
- система LC-20 XR series для сверхбыстрой хроматографии,
- системы LC-20 "Co-Sence" и "TOX.I.S." для анализа биологических жидкостей,
- система для препаративной хроматографии,
- системы для многомерной хроматографии,
- ВЭЖХ/МС и МСⁿ системы.

Каждая ВЭЖХ-система собирается из стандартных блоков, общих для всех систем (контроллеры, дегазаторы, термостаты), и специализированных блоков, которые выбираются в зависимости от поставленной аналитической задачи (автодозаторы, насосы, детекторы).

SHIMADZU
Solutions for Science
since 1875

НОВЫЕ КНИГИ



Ю. Бёккер

Хроматография.

Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза

Москва: Техносфера, 2009. — 472., ISBN 978-5-94836-212-0

Хроматография принадлежит к важнейшим процессам инструментальной аналитики. Прежде всего, она играет важную роль в таких областях науки как химия, биохимия и аналитика окружающей среды при определении малых количеств органических субстанций.

Книга представляет собой введение в основы хроматографических процессов и специальных методов капиллярного электрофореза; наряду с базовыми знаниями предлагается информация о новейших разработках в этих областях. При рассмотрении аналитических процессов в ходе сравнительного анализа описаны различные области их применения, а также преимущества и недостатки каждого метода в отдельности. Для полноты понимания отдельных методов каждое описание подкреплено соответствующими теоретическими выкладками.

Книга предназначена для специалистов в области инструментальных методов исследования химических процессов, для студентов и аспирантов-химиков.

Оглавление:

Глава 1. Введение

Глава 2. Техника хроматографии

Глава 3. Газовая хроматография

Глава 4. Высокоэффективная жидкостная (колоночная) хроматография

Глава 5. Тонкослойная хроматография

Глава 6. Ионная хроматография

Глава 7. Капиллярный электрофорез

Глава 8. Сверхкритическая флюидная хроматография

Глава 9. Качество анализа

Переводное издание, формат 70х100/16, переплет

ИНФОРМАЦИЯ О НОВИНКАХ:
www.technosphere.ru

Как заказать наши книги?

По почте: 125319 Москва, а/я 91

По факсу: (495) 9563346

E-mail: knigi@technosphere.ru

sales@technosphere.ru

$$1/V_R = A + B \times C_{\text{доб.}}$$

где V_R — удерживаемый объем, $C_{\text{доб.}}$ — доля добавки в элюенте, A , B — коэффициенты.

По виду уравнения видно, что эта зависимость гиперболическая.

На рис. 2.6 приведены графики классических зависимостей Скотта для двух веществ, селективность которых при всех составах элюента остается неизменной. Конечно, нередко так оно и бывает, но далеко не всегда.

На рис. 2.7а обе зависимости имеют классический вид, но селективность изменяется, и при больших концентрациях добавки даже изменяется порядок элюирования. Такие зависимости часто наблюдаются в «классической» НФ ВЭЖХ, либо при применении спиртов в качестве полярной добавки, либо в тех случаях, когда полярная добавка имеет свойства модификатора.

На рис. 2.7б обе зависимости имеют U-образный вид, что является признаком того, что в зависимости от состава элюента на одном и том же адсорбенте реализуются два различных вида хроматографии. Такой вид зависимостей очень характерен, например, для случая разделения гликозидов, имеющих полярную и неполярную части, на С18 фазах, также имеющих неполярные и полярные фрагменты. При низкой доле ацетонитрила в элюенте вода-ацетонитрил реализуется обращенно-фазовая хроматография, а при высокой — гидрофильная хроматография. Такие виды хроматографии часто называют *смешанными* (mixed mode).

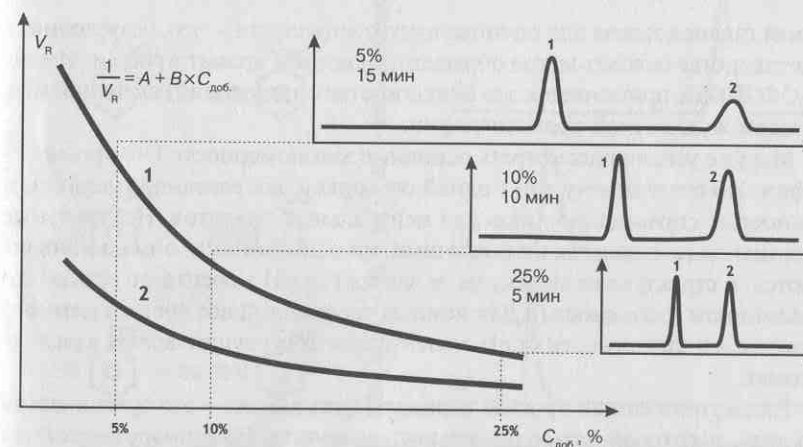


Рис. 2.6. «Классический» вид зависимости удерживания от концентрации добавки в элюенте (зависимость Скотта)

МС-АНАЛИТИКА

TEXTRONICA AG

3-2090

www.textronica.com

+7 (495) 995 88 90

+7 (495) 937 96 33

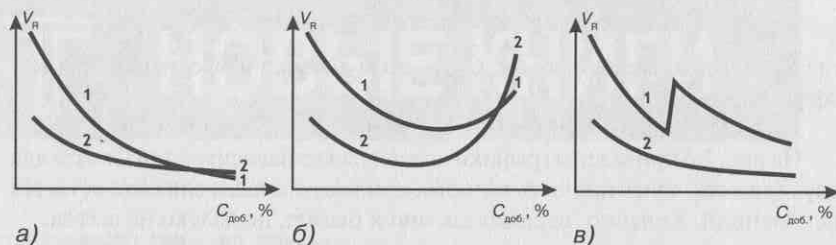


Рис. 2.7. Различные виды зависимостей удерживания от концентрации добавки в элюенте

На рис. 2.7в график одной зависимости имеет классический вид, а на другом виден резкий скачок при определенной доле добавки в элюенте. Такие случаи редки. Они встречаются в «классической» нормально-фазовой хроматографии, особенно на хиральных фазах (см. Приложение Б) и связаны с резкой перестройкой адсорбционного слоя, к которой разные вещества имеют разную чувствительность.

2.1.4. Удерживание ионных соединений на обращенной фазе. Модификатор в обращенно-фазовых системах. Универсальные ОФ системы. Примеры универсальных систем

Самая главная задача для начинающего специалиста — это, безусловно, в совершенстве освоить метод обращенно-фазовой хроматографии. Именно ОФ ВЭЖХ применяется для большинства определений, выполняемых методом жидкостной хроматографии.

Мы уже успели рассмотреть основные закономерности ОФ хроматографии. Но сразу отмечу, что с одной оговоркой: все сказанное целиком и полностью справедливо лишь для нейтральных анализов. Нейтральные соединения не являются ни кислотами, ни основаниями, они не ионизируются, и структура их молекулы не зависит от pH элюента, то есть от его кислотности (основности). Для ионных соединений все обстоит немного сложнее — в зависимости от pH элюента они могут существовать в разных формах.

Рассмотрим самый простой вариант. Пусть анализ — это органическая кислота, в которой есть одна кислотная группа. Например, бензойная кислота. Бензойная кислота в растворе может существовать в виде молекулы кислоты C_6H_5COOH и в виде аниона бензоата $C_6H_5COO^-$. У каждой

кислоты есть показатель кислотности pK_a . У сильных кислот pK_a меньше (вплоть до отрицательных значений), у слабых — больше. Бензойную кислоту с $pK_a = 4,2$ можно считать слабой кислотой.

При кислотности элюента $pH = pK_a$ концентрации молекулярной формы и ионной формы в растворе равны. Если «закислить» раствор сильной кислотой, добавив таким образом в раствор протонов H^+ , равновесие сместится в сторону образования молекулярной формы бензойной кислоты. То есть сильная кислота подавит ионизацию слабой. Наоборот, если «подщелочить» элюент, то кислота практически целиком перейдет в анион. Для бензойной кислоты для этого достаточно просто нейтрального $pH = 7$ (см. рис. 2.8).

Для того, чтобы в ОФ хроматографии получить высокую эффективность разделения ионных соединений и стабильные времена их элюирования, необходимо по возможности выбирать такой pH элюента, чтобы все анализируемые соединения существовали исключительно в одной форме — молекулярной или ионной. Если при pH элюента какие-либо

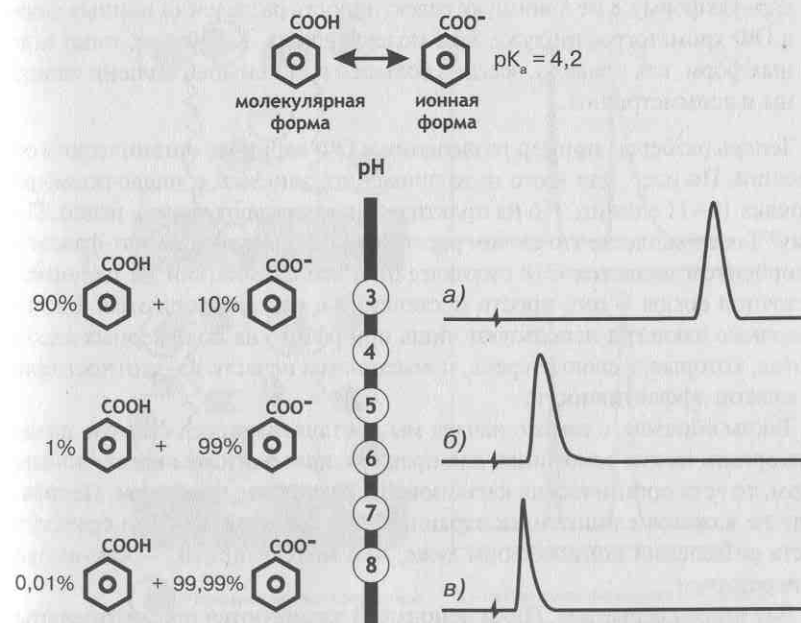


Рис. 2.8. Равновесие форм бензойной кислоты в водном растворе при различных pH. Вид ОФ хроматограммы бензойной кислоты в зависимости от pH водной основы элюента

соединения будут существовать в разных формах, их пики будут уширены и искажены, а времена удерживания будут очень нестабильны.

Для получения узкого симметричного пика бензойной кислоты водную часть элюента достаточно «закислить» до $\text{pH} = 3$ (довести до $\text{pH} 3$). Часто для этого применяется фосфорная кислота. При таком pH большая часть (около 90%) бензойной кислоты существует в растворе в виде молекулярной формы, чего вполне достаточно для получения хорошей хроматограммы. Вообще, $\text{pH} = 2,5$ более чем достаточно для ОФ хроматографирования большинства карбоксильных органических кислот. Меньший pH применяется в исключительных случаях.

При $\text{pH} 3$ мы фактически получаем пик молекулярной формы кислоты (см. рис. 2.8а), при $\text{pH} 7$ — пик ионной формы кислоты (см. рис. 2.8в). Ионная форма кислоты удерживается в ОФ хроматографии гораздо хуже молекулярной и имеет меньшее время удерживания. Это логично — ведь заряженная форма гораздо полярнее незаряженной.

В ОФ хроматографии предпочитают переводить аналиты в молекулярную форму, а не в ионную: селективность разделения ионных форм в ОФ хроматографии хуже, чем молекулярных. К тому же, пики ионных форм, как правило, всегда в большей или меньшей степени уширены и асимметричны.

Теперь разберем пример разделения в ОФ варианте органических оснований. По идее, для этого надо применять элюенты с «щелочным» pH порядка 10–11 единиц. Но на практике так поступают крайне редко. Почему? Так сложилось, что самым распространенным обращенно-фазовым адсорбентом является C18 силикагель, а все силикагели не переносят щелочной среды — они просто постепенно в ней растворяются. Так что щелочные элюенты используют лишь при работе на полимерных адсорбентах, которые, в свою очередь, применяются нечасто из-за относительно низкой эффективности.

Таким образом, с самого начала мы поставлены перед фактом: разделять органические основания, как правило, приходится в виде их ионных форм, то есть органических катионов. Здесь есть две проблемы. Первая с виду не кажется слишком уж страшной — всего-то и дел, что селективность разделения ионных форм хуже, чем молекулярных, — как-нибудь да переживем.

Вот вторая серьезнее. Пики оснований элюируются при нейтральных и «кислых» pH в виде широких, асимметричных пиков. Правда, в наши дни есть возможность купить дорогую фазу «премиум класса», на которой этот эффект будет сведен к минимуму. Но на недорогих фазах все бу-

дет выглядеть довольно печально. А в 80-х, к примеру, годах специальных адсорбентов еще не существовало, и картина была нерадостной постоянно. Но потом светлые головы придумали несколько приемов борьбы с «плохими» пиками органических оснований. Сейчас я о них и расскажу — я имею в виду приемы.

Согласно общепринятой сегодня точке зрения, уширение пиков оснований происходит в результате взаимодействия аналитов с примесями металлов и активными силанольными группами, присутствующими на поверхности адсорбента. Активная силанольная группа отличается от обычной тем, что около нее находится примесь металла. В результате, почти нейтральная группа Si-OH приобретает довольно высокую кислотность. Идея борьбы с нежелательными взаимодействиями может очень напомнить нам нормально-фазовую хроматографию: в элюент вводят модификатор в концентрации 1–2% — так же, как и в НФ варианте (см. рис. 2.9б). Только теперь это — триэтиламин, ТЭА (можно использовать и диэтиламин, ДЭА).

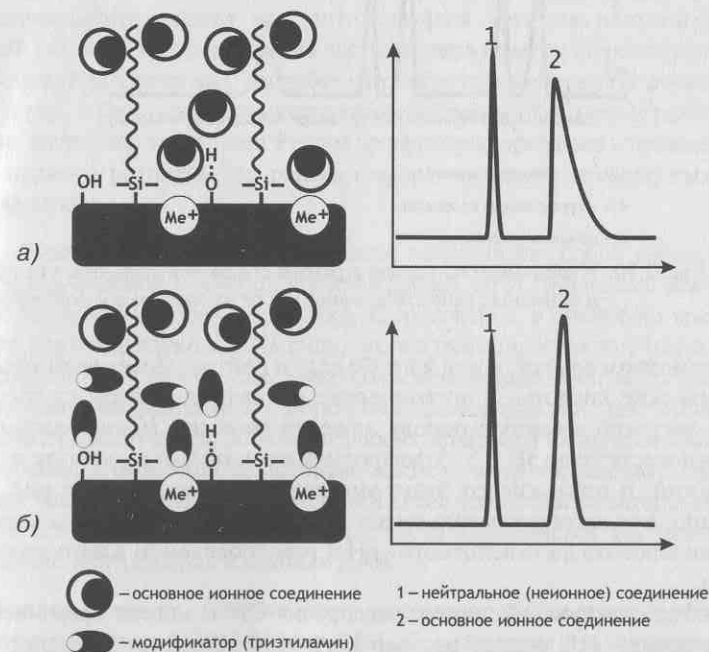


Рис. 2.9. Схема действия модификатора в ОФ хроматографических системах: а — система без модификатора, б — система с модификатором

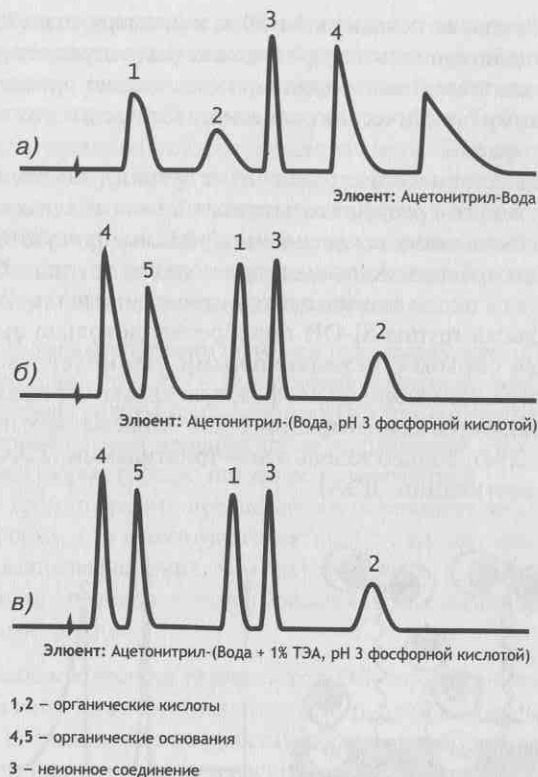


Рис. 2.10. Изменение ОФ хроматограммы смеси нейтральных, кислотных и основных веществ в зависимости от состава водной основы

Рассмотрим случай, когда в пробе есть и нейтральные соединения, и органические кислоты, и органические основания. В этом случае, конечно, разумно в водную основу элюента добавить модификатор, 1% ТЭА, и довести ее до pH 2,5–3 фосфорной кислотой. В результате и пики оснований, и пики кислот будут уширены минимально. На рис. 2.10 показано, как хроматограмма смеси веществ будет изменяться при доведении элюента до «кислотного» pH и при добавлении в него модификатора.

Вообще, данную ОФ систему: адсорбент C18 и элюент органический растворитель – (1% водный раствор ТЭА, pH 2,5 фосфорной кислотой) – можно назвать *универсальной ОФ системой* в том смысле, что она применима для разделения большинства органических соединений. Конечно,

не всегда она применима и далеко не всегда оптимальна – иначе других видов хроматографии просто бы уже не существовало. Но по универсальности, наверное, ей пока нет равных.

Применение этой системы подразумевает ряд ограничений, например, на способы элюирования и детектирования. Поскольку элюент содержит модификатор, система ограничено совместима с градиентным элюированием и несовместима с МС детектированием, что уменьшает ее ценность как системы для скринингового анализа. Однако, она хорошо применима для анализа продуктов органического синтеза и реакционных смесей. В этой области ее главное ограничение связано с тем, что определенные синтетические продукты подвержены гидролизу в водной среде.

Осталось сказать, что эта система может быть немного модифицирована для случая, когда органические основания удерживаются очень слабо. В элюент можно ввести второй модификатор – *ион-парный реагент*. Для увеличения удерживания оснований в водный буфер добавляют порядка 5–20 мМ (миллимоль/литр) гексил- или гептилсульфата – это соль сильной органической кислоты. Она достаточно хорошо удерживается на неполярном адсорбенте. Как следствие, адсорбент приобретает небольшой отрицательный заряд, в результате чего удерживание оснований (которые находятся в форме катионов) возрастает. Режим хроматографирования с применением ион-парного реагента (ion-pairing reagent) называют ион-парным (ion-pairing mode).

Фактически, ион-парный режим представляет собой гибрид обращенно-фазовой и ионной хроматографии. Этот гибридный режим нередко применяется на практике. Единственно, в последнее время его все реже реализуют на C18 силикагеле с применением ион-парного модификатора. Сейчас существуют современные адсорбенты, сочетающие неполярные фрагменты с ионообменными группами, так что необходимость ион-парной добавки в элюент отпадает. Режим хроматографирования на подобных адсорбентах можно назвать смешанным: обращенная фаза и ионный обмен (reversed-phase/ion exchange chromatography, RP/IEC). Этот режим, к примеру, часто применяется для разделения смесей нейтральных и ионных ПАВ.

В завершение привожу таблицу с возможными составами наиболее распространенных ОФ элюентов для C18 силикагеля – в порядке увеличения элюирующей силы (см. табл. 2.1). Вещества перечислены в типичном порядке их элюирования.

Таблица 2.1. Наиболее распространенные ОФ элюенты, применяемые с С18 силикагелем

Объект анализа	Элюент
Фруктовые органические кислоты (щавелевая, винная, аскорбиновая, молочная, уксусная, лимонная)	25 мМ водный раствор KH_2PO_4 , pH 2 фосфорной кислотой
Водорастворимые витамины (аскорбиновая кислота, никотиновая кислота, никотинамид, пиридоксин, кофеин, тиамин, биотин, рибофлавин)	Ацетонитрил-(10 мМ водный раствор гептилсульфоната Na с 1% ТЭА, pH 2,5 фосфорной кислотой) 10 : 90
Природные алкалоиды (например, скополамин, атропин, бруцин)	Ацетонитрил-(1% водный раствор ТЭА, pH 3,5 фосфорной кислотой) 15 : 85
Бензойная кислота, сорбиновая кислота, другие ароматические кислоты	Ацетонитрил-(вода, pH 2,5 фосфорной кислотой) 20 : 80
Фармацевтические препараты (парацетамол, кофеин, салициловая кислота, ацетилсалициловая кислота), консерванты и подсластители (сахарин, кофеин, аспартам, бензойная кислота, сорбиновая кислота)	Ацетонитрил-(1% водный раствор ТЭА, pH 2,5 фосфорной кислотой) 20 : 80
Пиридины и анилины	Ацетонитрил-(1% водный раствор ТЭА, pH 3,5 фосфорной кислотой) 50 : 50
Фармацевтические препараты (трициклические антидепрессанты)	Ацетонитрил-(1% водный раствор ТЭА, pH 3,5 фосфорной кислотой) 60 : 40

2.2. Принципы работы основных узлов хроматографа

2.2.1. Насос плунжерного типа. Изократическое и градиентное элюирование. Градиентные системы смешивания при высоком и низком давлении

Наиболее распространенными в ВЭЖХ являются насосы *плунжерного типа*. Плунжерный насос работает по принципу шприца. Его основными элементами являются камера с поршнем (головка) с двумя клапанами — на входе и на выходе. Первую половину цикла насос работает на забор жидкости: поршень движется назад, клапан на вход открыт, клапан на выход закрыт. Вторую половину цикла он работает на подачу жидкости: поршень движется вперед, клапан на вход закрыт, клапан на выход открыт. Фактически, такой насос, который называется *одноплунжерным*, не может обеспечить непрерывного потока жидкости.

Непрерывность потока достигается в *двухплунжерном* варианте, где есть два поршня, которые двигаются в противофазе. В момент, когда одна голов-

ка насоса работает на забор жидкости, другая работает на подачу и наоборот (см. рис. 2.11а). Таким образом, двухплунжерный насос содержит две головки и четыре клапана. Выходы с головок объединяются в одну линию, на которой установлен сливной клапан, перекрытый в обычном режиме работы. Он открывается при замене элюента или при промывке насоса.

Альтернативная схема устройства насоса двухплунжерного типа, приобретающая все большую популярность, приведена на рис. 2.11б. Головки соединены не параллельно, а последовательно, причем объем первой головки в два раза превосходит объем второй. Поршни также работают в противофазе. Когда меньшая головка работает на подачу, то большая работает на забор; клапан между головками перекрыт. Когда меньшая головка начинает работать на забор, то клапан между головками открывается. Большая головка, работая на подачу, одновременно обеспечивает меньшую головку жидкостью, а также поддерживает непрерывность потока. Подобная система требует наличия всего трех клапанов и лишь двух клапанов, если насос работает на постоянной скорости.

Поршень представляет собой сапфировый стержень; основными элементами клапана являются рубиновый шарик и рубиновое седло для шарика. Камера головки изготовлена из стали. Между поршнем и камерой есть полимерное уплотнение (как правило, из тефлона).

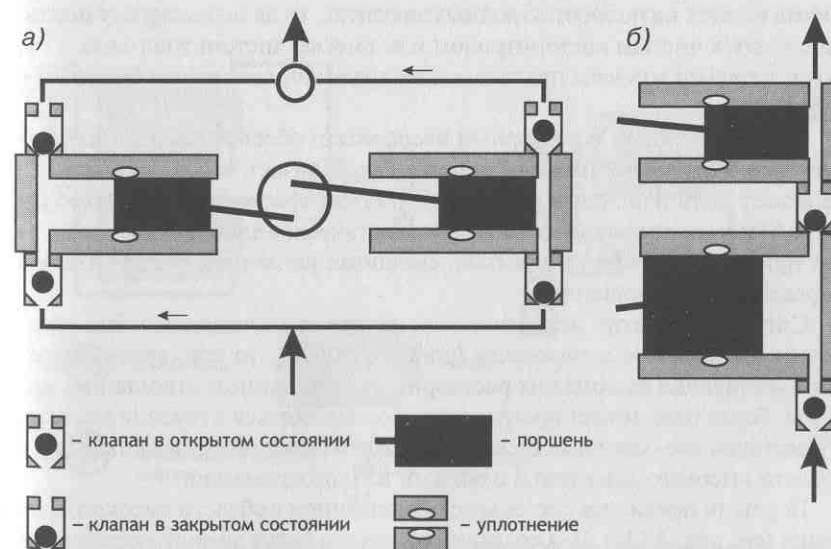


Рис. 2.11. Схемы плунжерных насосных систем высокого давления

Если применяемые элюенты содержат соли в значительной концентрации, уплотнения рекомендуется менять каждый год. И рекомендация эта возникла неспроста. Допустим, мы переходим от «чистого» элюента ацетонитрил-вода к элюенту, который содержит, к примеру, 20 мМ двукислого фосфата калия. Пока насос работает на новом элюенте — все в порядке. Но вот мы выключили прибор и ушли домой. Элюент начинает постепенно испаряться, а соли — оседать на узлах насоса: поршнях, шариках и седлах клапанов. И когда мы утром вновь запускаем насос, то кристаллики соли, те, что на поршнях, повреждают уплотнения, а те, что на шариках и седлах, мешают правильной работе клапанов. В результате, стабильность потока нарушается. Как это можно предотвратить?

Сейчас мы говорим об обращенно-фазовой хроматографии и водном элюенте. Он может содержать: неорганическую соль (как правило, это двукислый фосфат калия), органическую соль (триэтиламин при «кислом» рН), кислоту (как правило, фосфорную). В этом случае просто уходить домой, оставив систему под таким элюентом — довольно легкомысленно. В конце рабочего дня всю жидкостную систему следует промыть дистиллированной водой, допустим, около пятнадцати-двадцати минут. Соли гарантированно удалятся из насоса, колонки и кюветы детектора. Затем всю жидкостную систему надо заполнить водой с небольшой долей органического растворителя, который будет работать как бактериостатик. Если работа ведется на полностью водных элюентах, то на ночь систему можно заполнить и чистым ацетонитрилом или смесью ацетонитрил-вода 1 : 1. Более детально вопросы правильной эксплуатации насоса разбираются в разд. 2.3.

Сам по себе один плунжерный насос может обеспечить лишь *изократическое элюирование* (isocratic elution). Это означает, что состав элюента не может быть изменен в процессе хроматографирования. Если хроматограф позволяет проводить только изократическое элюирование, то элюент приходится готовить отдельно, смешивая различные растворители в определенном отношении.

Ситуация приятно меняется, если насосная система способна обеспечить *градиентное элюирование* (gradient elution), то есть автоматическое смешивание нескольких растворителей в заданном отношении, которое, более того, может программируемо изменяться в течение анализа. Существуют две основные схемы градиентных систем: со смешиванием в области высокого давления и в области низкого давления.

Первыми появились системы со смешиванием в области высокого давления (см. рис. 2.12а). Для создания градиента берут два плунжерных насоса, каждый из которых подает в жидкостную систему свой раствори-

тель. Традиционно, насос, который забирает растворитель меньшей элюирующей силы, называется насосом А (или линией А), а насос, который забирает растворитель большей элюирующей силы, называется насосом В (или линией В). Растворители с обеих линий подаются в смеситель и далее через инжектор в колонку. Соотношение смешиваемых растворителей устанавливается путем задания скоростей подачи на линиях: так, соотношение А-В 1 : 1 получается при равных скоростях подачи на линиях А и В. При градиентном элюировании отношение скоростей подачи программируемо изменяется, что приводит к изменению состава элюента.

Название этой системы напрямую указывает на то, что смеситель устанавливается после насосов, то есть смешивание растворителей происходит уже при высоком давлении. В большинстве случаев такая система имеет только две линии, не больше, и причина здесь чисто финансовая: еще одна линия — это еще один дорогостоящий насос.

Альтернативная система называется системой со смешиванием в области низкого давления (см. рис. 2.12б). Название указывает на то, что смеситель устанавливается до насоса — и это действительно так. В этом случае для работы необходим всего один плунжерный насос, а вот линий может быть много — до четырех в стандартных современных системах.

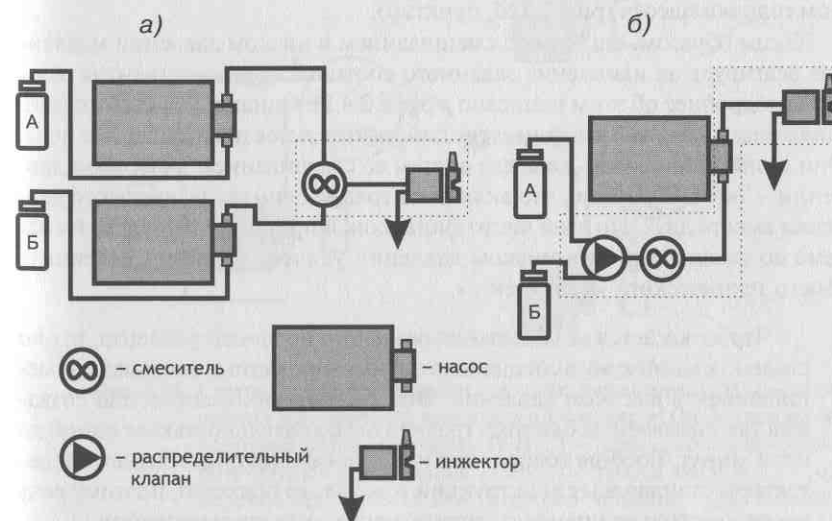


Рис. 2.12. Градиентные насосные системы со смешиванием в области высокого (а) и низкого (б) давления

Насос работает при постоянной скорости, а соотношение компонентов элюента задается при помощи распределительного клапана, который установлен до смесителя. Распределительный клапан отмеряет порции растворителя из каждой линии в заданном отношении. После него находится смеситель. Насос забирает готовый элюент из смесителя и под давлением подает его через инжектор в колонку. При градиентном элюировании отношение объемов порций, поступающих через распределительный клапан в смеситель, программируемо изменяется, что приводит к изменению состава элюента. Распределительный клапан и смеситель часто объединяются с дегазатором в одном блоке, комбинированном смесителе-дегазаторе.

Системы отличаются по объему отрезка жидкостной системы между забором отдельных растворителей и подачей готового элюента в колонку (она отмечена пунктиром на рис. 2.12). Наличие такого объема приводит к тому, что при изменении заданного отношения компонентов элюента реальный состав элюента не изменяется мгновенно, а только через определенное время.

В системе со смешиванием в высоком давлении этот отрезок меньше, его объем определяется в основном только объемом смесителя (рис. 2.12а, пунктир). В системе со смешиванием в низком давлении этот отрезок больше, его объем определяется в основном объемом смесителя и объемом головки насоса (рис. 2.12б, пунктир).

Таким образом, система со смешиванием в низком давлении медленнее реагирует на изменение заданного соотношения компонентов элюента (подробнее об этом написано в разд. 2.4.2). Однако, у систем со смешиванием в низком давлении есть одно значительное преимущество: цена. Они примерно на треть дешевле систем со смешиванием в высоком давлении — по той причине, что включают только один насос высокого давления вместо двух. По этой чисто финансовой причине градиентной системе со смешиванием в низком давлении удалось серьезно потеснить своего технического «конкурента».

Что же касается запаздывания реального профиля градиента, то оно сведено к минимуму в специально оптимизированных системах со смешиванием в высоком давлении. Эти системы применимы для создания так называемых быстрых градиентов с длительностью от одной до пяти минут. Вообще говоря, для проведения быстрых градиентов детекторы стандартных конструкций тоже плохо подходят, поэтому речь можно вести о специально оптимизированных хроматографах.

Список аналитических задач, для решения которых требуются быстрые градиенты, в настоящее время сравнительно невелик. Подоб-

ные задачи подразумевают проведение скрининга, причем, как правило, в условиях серийного анализа. Возможные области применения быстрых градиентов: фармакокинетика, органический синтез, протеомика, криминалистическая экспертиза.

2.2.2. Инжектор

Для ручного ввода пробы в хроматограф применяется ручной инжектор. По сути, это кран с двумя положениями (см. рис. 2.13а). В положении «LOAD» (загрузка) жидкая проба при помощи *аналитического шприца* с тупым наконечником иглы переносится в *дозировующую петлю*. При ручном переключении инжектора в положение «INJECT» (ввод) жидкая проба переносится из дозирующей петли на хроматографическую колонку. Инжектор находится в положении «INJECT» до момента введения следующей пробы.

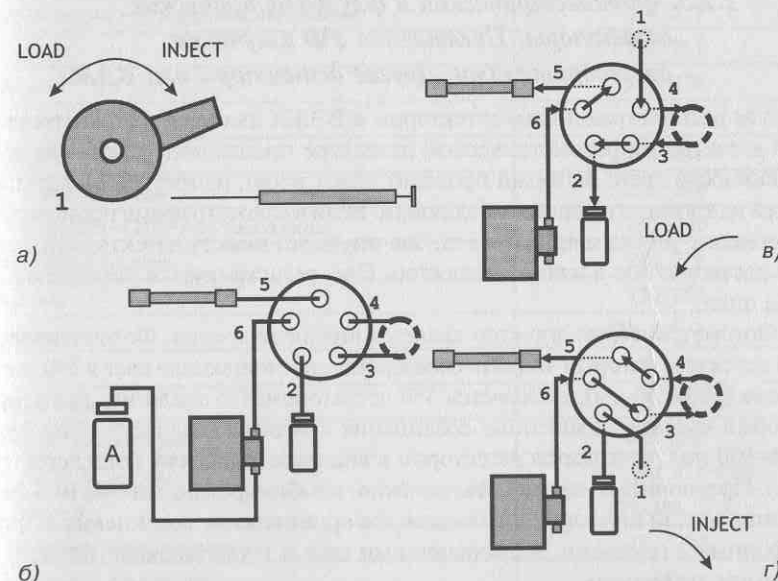


Рис. 2.13. Схемы, поясняющие работу ручного инжектора: LOAD — схема работы при повороте вентиля в положение «LOAD» (режим заполнения петли образцом), INJECT — схема работы при повороте вентиля в положение «INJECT» (режим анализа), 1 — отверстие для инъекции жидкого образца при помощи аналитического шприца (на лицевой стороне), 2 — слив образца; 3, 4 — дозирующая петля, 5 — выход к хроматографической колонке, 6 — вход для элюента (от насоса)

Стандартный ручной инжектор является шестиходовым краном. Один выход находится на лицевой стороне — это выход под аналитический шприц. Пять выходов под стандартные капилляры 1/16" находятся на задней стороне инжектора. Два выхода заняты под дозирующую петлю, один выход ведет к насосу, один выход — к колонке и один выход — это слив избытка пробы из дозирующей петли (см. рис. 2.13б).

Схемы работы инжектора в обоих положениях крана приведены на рис. 2.13в, г. В положении «LOAD» дозирующая петля (1-4-3-2) выключена из жидкостной системы прибора. Элюент под давлением поступает в этот момент напрямую в колонку (6-5), что позволяет вручную при атмосферном давлении заполнить дозирующую петлю. В положении «INJECT» дозирующая петля включается в общую жидкостную систему (6-3-4-5), что приводит к переносу пробы вместе с потоком элюента на колонку.

2.2.3. Фотометрический и флуориметрический детекторы. Поглощение УФ излучения растворителями. Другие детекторы для ВЭЖХ

Самым распространенным детектором в ВЭЖХ является фотометрический детектор. В фотометрическом детекторе происходит измерение интенсивности света, который проходит через элюат, непрерывно поступающей из хроматографической колонки. Если в какое-то время происходит ослабление интенсивности света, значит, через кювету детектора проходит растворенное в элюате вещество. Оно регистрируется детектором в виде пика.

Фотометрический детектор является аналогом зрения. Фотометрический детектор, который «видит» соединения, поглощающие свет в УФ диапазоне (190–400 нм), называется УФ детектором. По аналогии, детектор, который «видит» окрашенные соединения в видимом человеку диапазоне (400–900 нм), называется детектором в видимом диапазоне (Вид детектор). Предпочитают применять, конечно, комбинированный УФ/Вид фотометрический детектор. Он «видит» все органические соединения с хромофорными группами, поглощающими свет и в ультрафиолетовом, и в видимом диапазонах.

Большинство органических соединений не окрашены с точки зрения человека — они поглощают свет в УФ диапазоне. УФ детектор способен работать со светом в ближнем и среднем УФ диапазонах, то есть со светом с длиной волны от 190 до 400 нм. С более жестким излучением с длиной волны менее 190 нм работать бессмысленно, так как большинство пригодных для работы растворителей, из которых готовится элюент, сами непрозрачны в этом диапазоне (см. табл. 2.3). Самым прозрачным растворителем

Таблица 2.2. Характерные полосы поглощения функциональных групп и химических соединений в УФ диапазоне

Функциональная группа или химическое соединение	λ , нм
Сахариды	190–200
R-SH, тиоспирты	192, 225
R-COOH, R-CO(O)-R, карбоновые кислоты и сложные эфиры	195–210
R ₃ N, третичные алкиламины	199, 227
R-Br, алкилбромиды	200–210
R-S-R, алкилсульфиды	210, 229
Триглицериды, фосфолипиды	203–213
R-C(O)-NH ₂ , амиды	175, 214 (в воде)
R-C=C-C=C-R, ациклические диены	214–217
Толуол	207, 261
Фенол	210, 270
Алкины	223
R-C=C-C(O)-R	210–255
R-I, алкилиодиды	225–260
R-C(O)-NH-C(O)-Alk, карбамиды	230–240
Бензойная кислота	230, 270
Анилин	230, 280
Нафталин	220, 286, 312
Индол	225, 265
Нуклеозиды	240, 254, 260
R-NO ₂ , нитроалканы	270–280
R-C(O)-R, кетоны	180–190, 270–290
Антрацен	221, 256, 375
Полифенольные соединения	270–280
Пуриновые алкалоиды	280
R-CHO, альдегиды	290
R-NO, нитроалканы	300, 600–650
Оксикоричные кислоты	330
R-N=N-R, азоалканы	347–370
Каротиноиды	290, 380, 436, 440, 445, 480
Порфирины	400, 404

Таблица 2.2 (окончание)

Функциональная группа или химическое соединение	λ , нм
Флавонолы	470
Антоцианы	520
Синтетические красители	400–600

Таблица 2.3. Нижние границы λ_{\min} диапазона длин волн, в котором могут применяться растворители для жидкостной хроматографии. Показатели преломления n_D^{20} для различных растворителей

Растворитель	λ_{\min} , нм	n_D^{20}
Ацетон	326	1,3591
Ацетонитрил	210	1,3437
Бензол	276	1,5011
Бутанол	210	1,3993
Вода	200	1,3333
Н-Гексан	210	1,3750
Н-Гептан	210	1,3876
Декалин (цис)	215	1,4804
Декалин (транс)	215	1,4697
Диоксан	215	1,4223
1,2-дихлорэтан	235	1,4443
Дихлорметан (ДХМ)	235	1,4237
Диметилформамид (ДМФА)	270	1,4294
Изооктан	210	1,3916
Метанол	215	1,3286
Метилформиат	260	1,344
Н-пентан	210	1,3577
Н-пропанол	210	1,3854
Изопропанол	210	1,3776
Уксусная кислота (ледяная)	248	1,3715
Формамид	270	1,4472
Хлороформ	245	1,4456
Циклогексан	210	1,4263
Четыреххлористый углерод	265	1,4603
Этанол	210	1,3613
Диэтиловый эфир	210	1,3528
Этилацетат	251	1,3728

является вода. С действительно чистой водой (к примеру, марки «Для жидкостной хроматографии» или марки «Для спектрометрии») можно работать вплотную к границе 190 нм. На практике наиболее часто используется диапазон длин волн от 210 до 280 нм.

Любые примеси, содержащиеся в растворителях для хроматографии, сдвигают границу рабочего диапазона растворителя в сторону больших длин волн. При работе на коротких длинах волн применение «грязных» растворителей снижает чувствительность детектора. Это легко понять, представив, насколько отчетливо видно черное пятно на белом фоне и как трудно оно различимо, если фон темно-серый. Поэтому в жидкостной хроматографии применяют очень чистые растворители. Наиболее чистые растворители нужны для градиентного элюирования (см. разд. 2.4.2).

Принципиальная схема устройства фотометрического детектора приведена на рис. 2.14а. В детекторе есть источник света — лампа. В УФ детекторе это *дейтериевая лампа* (deuterium lamp), в Вид детекторе — обычная *вольфрамовая лампа* (tungsten lamp). В УФ/Вид детекторе (UV/Vis detector) установлены обе лампы.

Сначала свет от лампы попадает на *дифракционную решетку*, где раскладывается в спектр. Если лампа вольфрамовая, происходит фактически то же самое, что и при попадании искусственного освещения на поверхность CD диска: свет раскладывается в радугу. После дифракционной решетки стоит препятствие с узкой щелью. Щель нужна для того, чтобы выбирать пучок света только определенной длины волны (определенного цвета). Поворотом дифракционной решетки на щель направляется свет заданной длины волны. Все это устройство из дифракционной решетки, поворотного зеркала и щели называется *монохроматором*. С его помощью из полихроматического света лампы выделяется достаточно узкий пучок.

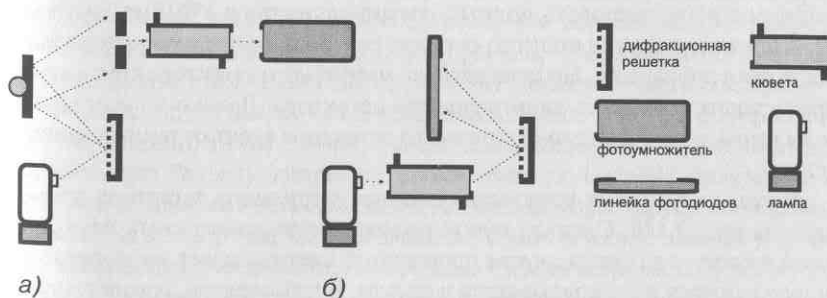


Рис. 2.14. Схемы устройства сканирующего (а) и диодно-матричного (б) спектрофотометрических детекторов

Его монохроматичность определяется шириной спектральной щели, которая в стандартных фотометрических детекторах составляет 5 нм. То есть, если детектору задана длина волны 254 нм, то реально от дейтериевой лампы пропускается свет в интервале от 251,5 до 256,5 нм.

Далее монохроматичный свет попадает на проточную кювету, через которую прокачивается элюат. Интенсивность прошедшего через элюат света регистрируется фотоумножителем. Устройство фотоумножителя таково, что позволяет регистрировать даже очень слабый свет.

В самых простых фотометрических детекторах не предусмотрена возможность быстрого переключения длин волн в течение анализа, и вся хроматограмма прописывается на одной, предварительно заданной длине волны.

Напротив, сканирующие фотометрические детекторы позволяют проводить регистрацию хроматограммы сразу на нескольких длинах волн. Быстрое переключение с первой заданной длины волны на вторую (третью, четвертую ... и обратно на первую) осуществляется поворотом дифракционной решетки. Таким образом, в течение одного анализа получают сразу несколько хроматограмм.

Стандартные сканирующие детекторы способны регистрировать одновременно две хроматограммы на двух длинах волн, причем длины волн можно программируемо изменять в течение анализа. Наличие двух хроматограмм на двух длинах волн дает видимые преимущества в надежности идентификации веществ. Каждое вещество регистрируется в виде двух пиков, соответственно, отношение высот этих пиков, спектральное отношение, является еще одной характеристикой вещества в дополнение ко времени удерживания (см. рис. 2.15).

Кроме того, существуют диодно-матричные фотометрические детекторы (diode-array detector, DAD), которые способны в каждой точке хроматограммы регистрировать полный спектр вещества в УФ/Вид диапазоне. Конечно, наличие полного спектра еще больше увеличивает надежность идентификации. Но цена диодно-матричного детектора почти втрое превосходит стоимость сканирующего детектора. Далеко не всегда выгоды применения диодно-матричного детектора стоят отданных за него денег.

Упрощенная схема устройства диодно-матричного детектора приведена на рис. 2.14б. Сначала пучок полихроматического света проходит через кювету с элюатом, затем прошедший свет попадает на дифракционную решетку и раскладывается в спектр. Часть спектра, соответствующая УФ и видимому диапазонам, полностью регистрируется диодной матрицей — линейкой, состоящей из примерно двух сотен светодиодов.

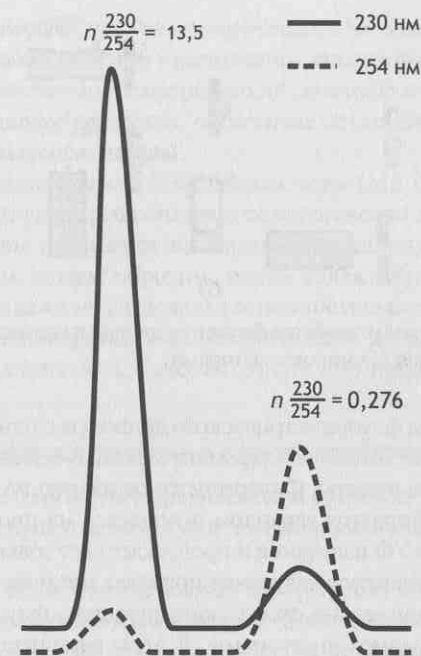


Рис. 2.15. Участок хроматограммы на длинах волн 230 и 254 нм из двух пиков с разными спектральными отношениями n (230/254)

Вторым по распространенности среди детекторов для ВЭЖХ является флуориметрический детектор (fluorescence detector, FLD). Его действие основано на явлении флуоресценции — свечения вещества после облучения его светом. Излучение света веществом, эмиссия (emission, em.), всегда происходит в более длинноволновой области, чем первоначальное облучение — возбуждение (excitation, ex.). Как правило, возбуждение осуществляется ультрафиолетом, а эмиссия происходит в видимой части спектра.

Флуоресцируют далеко не все органические вещества. Для флуоресценции необходимо, чтобы структура соединения включала сопряженную ненасыщенную систему, например, ароматическую систему, желательна с электрон-донорными заместителями. Хорошо флуоресцируют полиароматические углеводороды, их производные, ароматические амины. Подобные соединения определяются с помощью флуориметрического детектора очень селективно и с большой чувствительностью. Достаточно часто флуориметрический детектор применяется для определения следовых концентраций различных соединений в виде их различных производных.

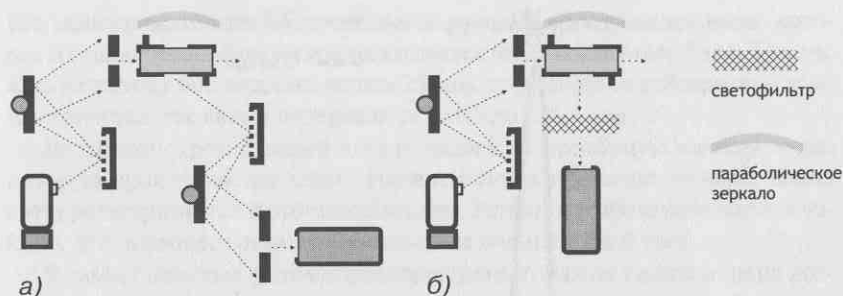


Рис. 2.16. Схемы устройства флуориметрических детекторов с одним (а) и двумя (б) монохроматорами

Схема устройства флуориметрического детектора с одним монохроматором приведена на рис. 2.16б. Монохроматический пучок света в УФ диапазоне попадает на торец кюветы. Флуоресцентное излучение, выходящее через стенки кюветы, собирается зеркалом и подается на простой оптический фильтр. Он отсекает УФ излучение и пропускает свет только в видимом диапазоне. Все флуоресцентное излучение попадает затем на фотоумножитель.

На рис. 2.16а приведена схема сканирующего флуориметрического детектора с двумя монохроматорами. В этом варианте флуоресцентное излучение попадает во второй монохроматор, где раскладывается в спектр флуоресценции. Таким образом, сканирующий флуориметрический детектор позволяет получать сразу несколько хроматограмм одновременно, каждую на определенной длине волны — только не поглощения, как в фотометрическом детекторе, а наоборот, излучения (эмиссии).

В жидкостной хроматографии также применяют рефрактометрический детектор и электрохимические детекторы: кондуктометрический и вольтамперометрический.

Рефрактометрический детектор (refractive index detector, RID) применяется для определения веществ, плохо поглощающих свет даже в ультрафиолетовом диапазоне, например, сахаров, многоядерных спиртов, различных поверхностно-активных веществ. Детектор регистрирует коэффициент преломления, или показатель рефракции (refractive index, RI) n_D^{20} элюата.

Кондуктометрический детектор (conductivity detector) является основным детектором в ионной хроматографии. Он измеряет электрическую проводимость элюата. Кондуктометрический детектор применим для определения любых соединений, существующих в форме ионов: неорганических солей (анионов и катионов), органических кислот в анионной форме и органических оснований в катионной форме.

Вольтамперометрический детектор (electro-chemical detector, ECD) измеряет ток, возникающий при приложении заданного потенциала окисления к элюату. Вольтамперометрический детектор с большой чувствительностью определяет вещества, способные легко окисляться: фенолы, редуцирующие сахараиды, амины.

Масс-спектрометрические ВЭЖХ детекторы (MS detector, MSD), безусловно, по своей универсальности и селективности не имеют себе равных. МС детекторы позволяют измерять молекулярную массу химических соединений и, таким образом, очень селективно определять их в весьма сложных и даже не разделенных полностью смесях. Все, что ограничивает быстрое внедрение масс-селективных детекторов в практику ВЭЖХ, — это их стоимость, которая до сих пор продолжает оставаться весьма высокой.

2.2.4. Соединение блоков в единую жидкостную систему

Соединение блоков хроматографа: насосной системы, инжектора, колонки и детектора — осуществляется при помощи специальных капилляров и фитингов.

Капилляр для ВЭЖХ представляет собой трубку с внешним диаметром 1/16" (около полутора миллиметров) и внутренним диаметром от 50 до 300 мкм (глазом разглядеть такое отверстие практически невозможно). Раньше применялись стальные капилляры, но сейчас практически уже везде применяют пластмассовые капилляры из материала PEEK (polyetherether ketone).

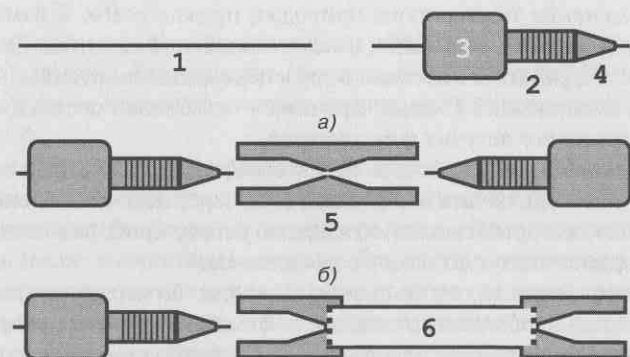


Рис. 2.17. Схемы соединений (а) двух капилляров, (б) капилляра и колонки: 1 — капилляр, 2 — фитинг, 3 — зажимной винт, 4 — ферула, 5 — муфта, 6 — колонка

Все соединения капилляров между собой и с блоками хроматографа осуществляются при помощи специальных зажимных уплотнительных винтов — фитингов. Фитинг состоит из зажимного винта и конусообразного уплотнения — ферулы. Винт и ферула могут быть выполнены как единое изделие из РЕЕК. Такой фитинг, как правило, уплотняется вручную. Если винт отделен от ферулы, то ферула выполняется из РЕЕК, а винт — из стали, под гаечный ключ. Такой фитинг можно аккуратно «подтянуть» гаечным ключом.

Колонка соединяется с инжектором и детектором также при помощи капилляров и фитингов. Два капилляра соединяются между собой при помощи муфты и двух фитингов (см. рис. 2.17).

2.3. Общие рекомендации к проведению

хроматографического анализа.

Рабочее место. Приготовление элюента.

Заполнение насосной системы элюентом.

Замена одного элюента на другой,

смешивающийся или несмешивающийся

с предыдущим. Фильтрация пробы.

Применение ин-лайн фильтров

и предколонок. Промывка узлов хроматографа

Помещение, где устанавливается жидкостной хроматограф, желательно, должно кондиционироваться. Если у хроматографа нет термостата колонок, то изменение температуры приводит, прежде всего, к изменению удерживания, а также, возможно, и селективности разделения. Даже если термостат есть, работать в летнюю жару в некондиционируемом помещении почти невозможно. Главная причина — изменение состава элюента из-за испарения его летучих компонентов.

Качество электропитания для хроматографа должно быть на высоком уровне. Лучше подключать все блоки к сети через источник бесперебойного питания, который сможет обеспечить работу прибора в течение десяти-пятнадцати минут до завершения анализа.

О приготовлении элюента на водной основе. Отмерять каждый компонент элюента необходимо отдельно, не смешивая элюент прямо в мерном цилиндре. Если элюент содержит неорганическую соль или соль ион-парной добавки, главное — после растворения соли в водной основе профильтровать водную основу или сам элюент: небольшие кристаллы или механические примеси могут повредить уплотнения насоса.

Если насосная система не имеет автоматического дегазатора, то элюент необходимо дегазировать. Самый простой способ одновременного дегазирования и фильтрации элюента — пропустить его через специальный пористый фильтр, соединенный с колбой Бунзена и вакуумной линией (например, от водоструйного насоса).

О заполнении насосной системы элюентом. Допустим, что «история» системы нам неизвестна, то есть мы не знаем, с каким элюентом на хроматографе работали до нас. В этом случае систему сначала надо промыть водой, а затем изопропанолом (или ацетоном) и только после этого заполнять элюентом.

Порядок действий примерно таков. В линию А ставят емкость с дистиллированной водой. Отсоединяют насос от колонки, капилляр к колонке направляют в пустую емкость. Открывают сливной клапан, соединяют его со специальным шприцем для промывки насосной системы или обычным медицинским шприцем на 25 мл. Аккуратно тянут шток шприца на себя; вода заполняет всю жидкостную систему насоса и начнет набираться в шприц. Аккуратно отсоединяют промывной шприц, закрывают клапан на слив. Включают насос, поставив скорость подачи, к примеру, 5 мл/мин. Промывают систему водой в течение 10–15 мин. Далее, повторяют эту же процедуру, применяя вместо воды изопропанол или ацетон.

Теперь систему можно заполнять любым элюентом — и на водной основе, и на основе гексана. Для этого достаточно, поставив в линию А элюент и отсоединив насос от колонки, установить скорость подачи порядка 5 мл/мин и промыть насосную систему элюентом в течение 5–10 мин (общий объем насосной системы включая все трубки и капилляры вряд ли превышает 20 мл).

Так же производится замена одного элюента другим, смешивающимся с предыдущим. Единственно, после применения элюента с водно-солевым буфером насосную систему желательно промыть дистиллированной водой.

При переходе от водного элюента к элюенту на основе гексана последовательное промывание дистиллированной водой и затем изопропанолом (ацетоном) необходимо проводить для всей жидкостной системы, включая насос, инжектор и детектор. Для этого на время промывки выход из инжектора на колонку можно напрямую соединить капилляром с детектором. После промывки системы изопропанолом (ацетоном) системе следует промыть элюентом. И только затем можно устанавливать и кондиционировать хроматографическую колонку.

Для обратного перехода, с элюента на основе гексана к водному элюенту, необходимо также промывать жидкостную систему, включая насос,

инжектор и детектор, — но сначала изопропанолом (ацетоном), а затем водой. Далее следует промывка системы элюентом, установка и кондиционирование колонки.

О применении ин-лайн фильтров и предколонок. При проведении потоковых определений очень рекомендую устанавливать перед основной колонкой предколону. *Предколонка* (pre-column) — это очень короткая колонка, как правило, длиной 1 см, которая служит для защиты основной колонки от сильно удерживаемых, загрязняющих колонку компонентов проб. Предколонка может быть цельной или картриджной. В первом случае корпус предколонок оканчивает фитингом, при помощи которого она напрямую соединяется с колонкой. Во втором случае предколонка-картридж помещается в разборный держатель, который при помощи капилляра соединяется с основной колонкой.

Предколону можно менять периодически, к примеру, раз в месяц. Это не значит, что их надо выбрасывать. До определенного момента их можно регенерировать.

Кроме химических веществ, загрязняющих колонку, в пробе могут присутствовать механические примеси. От крупной взвеси и осадка можно избавиться, «прокрутив» пробы на небольшой настольной центрифуге (они весьма дешевы и надежны). Настоятельно не советую фильтровать пробы через какие бы то ни были фильтры; это очень долго, трудоемко и сомнительно с точки зрения правильности количественного определения.

В пробе могут присутствовать и тонкие взвеси — то есть очень мелкие, порядка микрометров, механические примеси. Они легко засоряют входной фильтр колонки или предколонок, что приводит к росту давления в системе. Характерный признак присутствующей в пробе нерастворимой взвеси — ее опалесценция (проба выглядит немного мутной, рассеивающей свет). Но иногда, когда механические частицы очень мелкие, проба может выглядеть совершенно прозрачной.

Метод борьбы со взвесью — применение ин-лайн фильтров. *Ин-лайн фильтр* — это пористый фильтр с диаметром пор порядка одного микрометра, который, подобно предколоне, устанавливается перед колонкой (или перед предколонкой) в специальном разборном держателе. Ин-лайн фильтр также можно менять и до какого-то момента регенерировать.

Если перед основной колонкой последовательно установить ин-лайн фильтр и предколону, то она становится относительно защищенной и от микроскопических механических, и от химических загрязнений.

Узлы хроматографической системы необходимо периодически промывать. Ручной инжектор промывают для снижения риска последовательного загрязнения проб; эту процедуру можно проводить и по несколько

раз в день. По той же причине следует уделять внимание чистоте автосамплера. Раз в неделю можно устраивать «генеральную уборку» колонки — чтобы в ней не накапливались загрязняющие вещества, которые затем могут появляться на хроматограммах в виде «горбов» и дрейфа базовой линии. К примеру, обращенную фазу следует периодически промывать чистым органическим растворителем.

Раз в месяц следует мыть резервуары для подвижной фазы. И, разумеется, в конце рабочего дня необходимо промывать всю жидкостную систему хроматографа. В обращенно-фазовом режиме систему сначала промывают дистиллированной водой в течение 15–20 мин, а затем 15–20 мин водой с 5–10%-ной добавкой органического растворителя.

2.4. Изократическое и градиентное элюирование.

Применение рецикла элюента

при изократическом элюировании.

Техника градиентного элюирования,

«вогнутые» и «выпуклые» профили

градиента. Общие рекомендации

к проведению градиентного элюирования

Существуют два способа элюирования: изократический и градиентный. При *изократическом элюировании* (isocratic elution) применяется один элюент постоянного состава. Изократическое элюирование требует значительно меньших затрат времени и растворителей из расчета на один анализ. По этой причине рутинные определения стараются по возможности проводить в изократическом режиме.

Применение изократического элюирования позволяет тратить минимальные объемы дорогостоящих растворителей — стоит лишь «замкнуть» жидкостную систему хроматографа, то есть направить слив элюата обратно в емкость для забора элюента (см. рис. 2.18). Этот нехитрый прием называют *рециклом* элюента.

Сначала может показаться, что в таком режиме «чистый» элюент быстро загрязняется компонентами пробы из элюата. Но это не так. Достаточно сравнить объем пробы (допустим, 10 мкл) и объем элюента (например, 1 л, то есть 1 000 000 мкл). Элюента больше в 100 000 раз, то есть даже при проведении 100 определений уровень фона детектора увеличится всего на 0,1% от оптической плотности пробы. Это немного. Максимум плохого, что может произойти, — небольшой дрейф базовой линии.

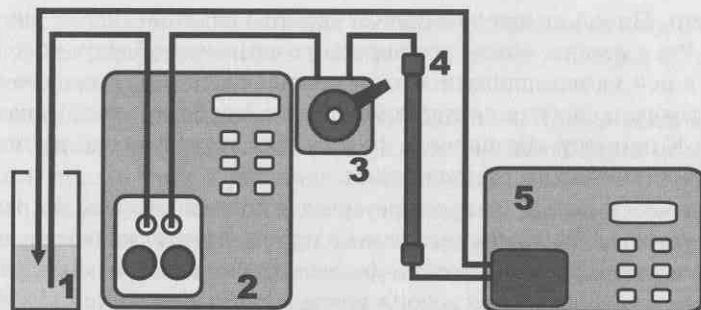


Рис. 2.18. Схема жидкостной системы с рециклом элюента

Зато рецикл позволяет настолько серьезно сэкономить на растворителях, что даже самые дорогие и самые чистые из них (к примеру, марки «for liquid chromatography») по цене становятся доступными любой лаборатории. И это правильный путь — работать в изократическом режиме на рецикле с особо чистыми растворителями. И работа качественная, и затраты адекватные.

Но, конечно, даже в режиме рецикла элюент не будет «вечным». Определенный объем элюента теряется каждый раз при замене подвижной фазы. Только на промывку жидкостной системы и хроматографической колонки, заполненных предыдущей подвижной фазой, в слив уходит порядка 50 мл элюента. «Замкнуть» же жидкостную систему можно только после проведения кондиционирования колонки.

При *градиентном элюировании* (gradient elution) состав элюента программируемо изменяется в течение анализа, а именно: в нем увеличивается доля добавки. Программу изменения состава элюента (подвижной фазы, ПФ) часто называют профилем градиента. Начало хроматограммы соответствует «слабому» элюенту с низкой элюирующей силой, конец хроматограммы — «сильному» элюенту с высокой элюирующей силой.

Смысл градиента заключается в том, что в рамках одного анализа можно добиться приемлемого разделения групп веществ, имеющих в изократическом режиме огромную разницу в удерживании (см. рис. 2.19).

Хочу отметить, что далеко не всегда предпочтение градиентного элюирования изократическому бывает оправдано. Я рискнул выделить две ситуации, в которых начинающий хроматографист рискует совершить ошибку, решив заменить долгий изократический анализ на быстрый градиентный.

Случай первый — селективность разделения всех компонентов достаточно хорошая, критических пар на хроматограмме нет (см. рис. 2.20а).

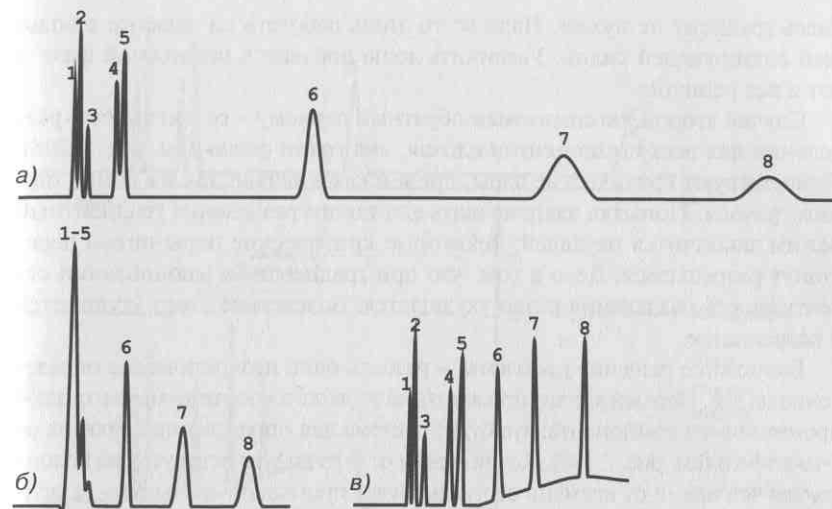


Рис. 2.19. Разделение смеси из сильно различающихся по удерживанию компонентов. Изократическое элюирование на «слабом» элюенте (а), хорошее разделение, большая продолжительность анализа. Изократическое элюирование на «сильном» элюенте (б), быстрый анализ, плохое разделение. Градиентное элюирование (в), старт с более «слабого» элюента, чем (а), завершение при более «сильном» элюенте, чем (б), хорошее разделение, быстрый анализ

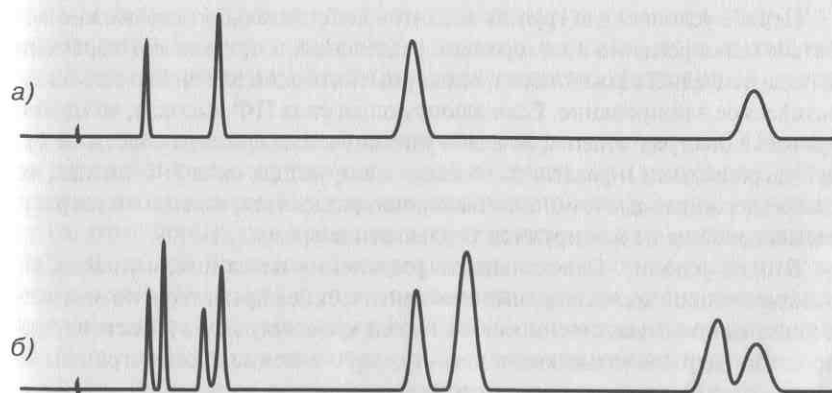


Рис. 2.20. Примеры разделений, где переход на градиентное элюирование нецелесообразен

Здесь градиент не нужен. Надо всего лишь работать на элюенте с большей элюирующей силой. Увеличить долю добавки в подвижной фазе — вот и все решение.

Случай второй, по симптомам обратный первому — селективность разделения для всех компонентов плохая, «на грани фола» (см. рис. 2.20б). Присутствуют критические пары, причем как в начале, так и в конце хроматограммы. Попытка адаптировать для такого разделения градиентный режим закончится неудачей: некоторые критические пары пиков перестанут разрешаться. Дело в том, что при градиентном элюировании селективность разделения резко ухудшается. Вследствие этого ухудшается и разрешение.

Возможное решение проблемы — разбить одно изократическое определение на два. Первый анализ проводить на этом же элюенте до момента элюирования 5-го компонента: это будет система для определения аналитов от 1-го до 5-го (см. рис. 2.19а). Компоненты от 6-го до 8-го останутся на колонке, так что время от времени ее нужно будет промывать «сильным» элюентом. Второй анализ надо проводить на «сильном» элюенте: это будет система для определения аналитов от 6-го до 8-го, которые выйдут за приемлемое время (см. рис. 2.19б). Компоненты от 1-го до 5-го в этом случае не будут удерживаться, то есть выйдут в нулевое время одним неразделенным пиком.

Теперь надо установить, в каких случаях градиент оправдан и как составлять программу градиента в каждом конкретном случае. Наверное, из предыдущих примеров уже можно понять, что видимую пользу от применения градиентного элюирования можно извлечь только в определенных случаях, когда выполняются два условия.

Первое условие: для группы аналитов действительно невозможно добиться одновременно и их хорошего разделения, и приемлемого времени выхода последнего компонента, если применять один элюент, то есть изократическое элюирование. Если элюирующая сила ПФ высокая, то можно провести быстрый анализ, но слабо удерживаемые аналиты совсем не будут удерживаться и разделяться. Если элюирующая сила ПФ низкая, то слабо удерживаемые компоненты хорошо разделятся, но сильно удерживаемые вообще не элюируются за адекватное время.

Второе условие. Селективность разделения не слишком низкая: на изократической хроматограмме есть критические пары пиков, но они расположены преимущественно либо в начале хроматограммы (то есть в группе слабо удерживаемых компонентов), либо в конце хроматограммы (в группе сильно удерживаемых компонентов).

Рисунок 2.21 иллюстрирует случай, когда селективность является критической для слабо удерживаемых компонентов. Профиль градиента в

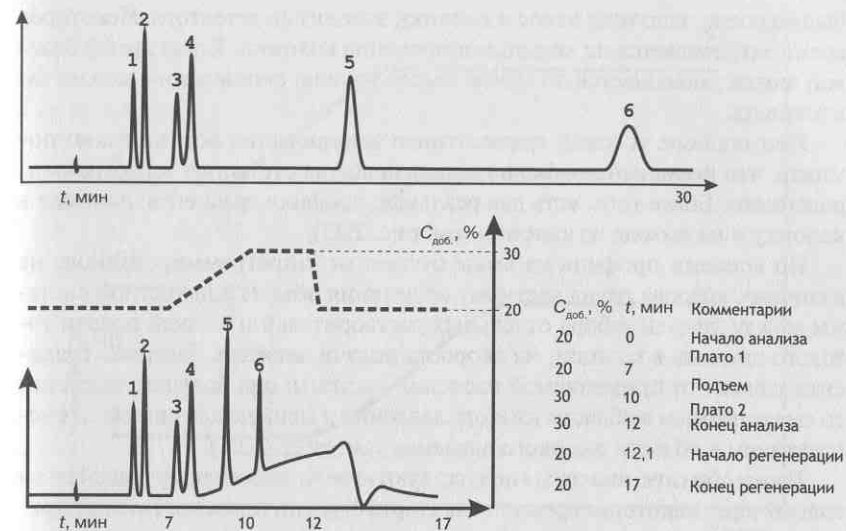


Рис. 2.21. Пример применения «вогнутого» градиента

этом случае должен быть «вогнутым»: пока элюируются слабо удерживаемые аналиты, необходимо поддерживать постоянный состав элюента, а изменять его надо начинать где-то в средней части хроматограммы.

Случай, когда селективность является критической для сильно удерживаемых компонентов, показан на рис. 2.22. Профиль градиента здесь должен быть «выпуклым»: градиент надо начинать с самого начала. Но в определенный момент его нужно остановить и дальше, пока элюируются сильно удерживаемые аналиты, поддерживать постоянный состав элюента.

Каждый отрезок профиля градиента называется ступенью. Ступень, на которой происходит увеличение элюирующей силы подвижной фазы, называется подъемом. Ступень изократического элюирования называется «плато». Форму ступени предпочитают делать линейной, хотя программа прибора, как правило, позволяет выбирать ее из списка различных зависимостей. Последней ступенью градиента является регенерация, когда колонка заново кондиционируется «слабым» элюентом начального состава. После регенерации можно снова запускать градиентный анализ.

Когда начинается регенерация, сбор данных с детектора в память, в файл анализа можно останавливать — анализ закончен. Но работа детектора продолжается, и мы видим резкий скачок базовой линии, когда «сла-

бый» элюент, заполнив насос и колонку, доходит до детектора. Некоторое время затрачивается на кондиционирование колонки. Когда дрейф базовой линии уменьшается до приемлемого уровня, регенерацию можно заканчивать.

При подборе условий градиентного элюирования всегда нужно помнить, что реальный профиль градиента всегда отстает от запрограммированного. Более того, есть два реальных профиля градиента: на входе в колонку и на выходе из колонки (см. рис. 2.23).

По времени профиль на входе отстает от запрограммированного на величину, которая равна частному от деления объема жидкостной системы между линией забора отдельных растворителей и линией подачи готового элюента в колонку, на скорость подачи элюента. Задержка градиента зависит от применяемой насосной системы: она больше для систем со смешиванием в области низкого давления и меньше для систем со смешиванием в области высокого давления (см. разд. 2.2.1).

Таким образом, аналиты «почувствуют» увеличение элюирующей силы только через некоторое время после старта ступени подъема. По этой причине программировать момент подъема нужно с упреждением, величину которого для данной жидкостной системы нужно измерить или рассчитать. Теперь комментарии.

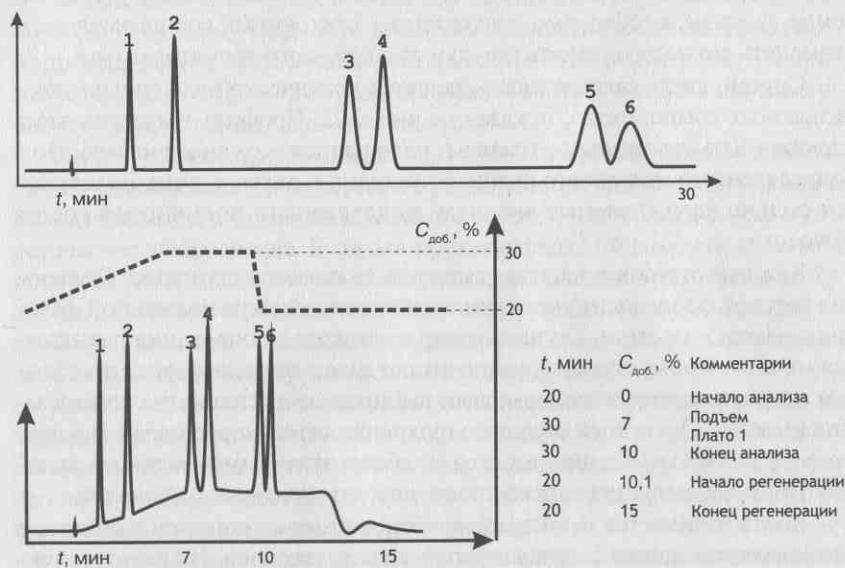


Рис. 2.22. Пример применения «выпуклого» градиента

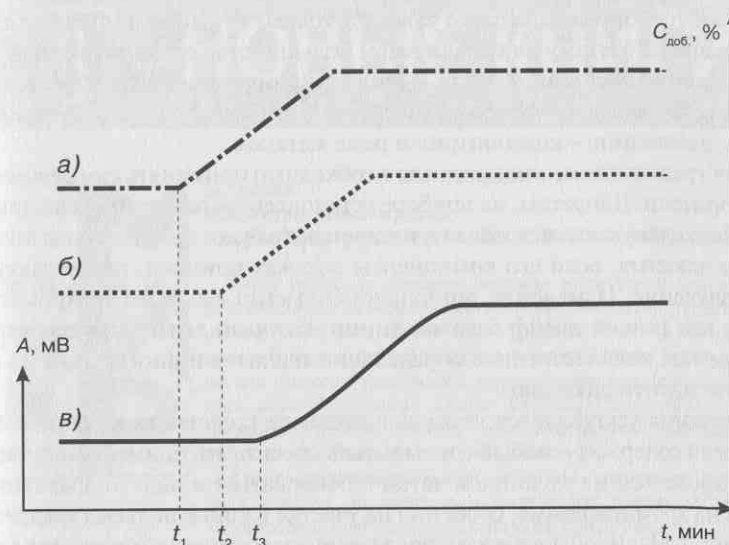


Рис. 2.23. Профили градиента: запрограммированный (а), на входе в колонку (б), на выходе из колонки (в)

Сужение хроматографических зон. При «крутом» или «затяжном» градиенте (то есть при большом перепаде элюирующей силы или продолжительном по времени подъеме) хроматографические зоны элюирующихся компонентов значительно сужаются. Таким образом, в конце подъема выходят более узкие пики, чем в начале. Может показаться, что это приводит к улучшению разделения, но это не так. Разделение в градиенте, наоборот, уменьшается по причине ухудшения селективности. Но вот высота пиков действительно увеличивается, то есть возрастают отношения сигнал/шум и предел определения.

Экономия растворителей. При градиентном элюировании нельзя воспользоваться рециклом элюента, поэтому вопрос экономии растворителей надо решать другими путями. Например, в градиенте лучше работать на колонках со внутренним диаметром 2 мм, а не 4,6 мм, что приведет к уменьшению объемной скорости расхода элюента в $(4,6/2)^2 \approx 5,3$ раза при той же линейной скорости.

Применение в обращенно-фазовой хроматографии. Градиентное элюирование в принципе применимо для проведения рутинных анализов только в тех случаях, когда адсорбционное равновесие в системе устанавливается быстро и свойства адсорбента не зависят от состава элюента.

Этим требованиям хорошо отвечает только обращенно-фазовая хроматография. Поэтому в подавляющем большинстве случаев градиентное элюирование применяется для выполнения определений в обращенно-фазовых условиях. «Слабым» элюентом является вода или водно-солевой буфер, добавками — ацетонитрил и реже метанол.

Для градиентного элюирования необходимо применять самые чистые растворители. Допустим, на приборе установлен фотометрический детектор. Поскольку состав элюента изменяется, то будет изменяться и поглощение элюента, если его компоненты содержат примеси, поглощающие УФ излучение. Изменение поглощения элюента выглядит на хроматограмме как резкий дрейф базовой линии, который делает невозможным нормальное количественное определение аналитов и иногда даже их надежную идентификацию.

Ситуация усугубляется, если значительное количество органических примесей содержит «слабый», начальный элюент. Эти примеси могут концентрироваться на колонке и затем элюироваться в виде «паразитных» пиков на хроматограмме, особенно на участке в конце подъема градиента (см. рис. 2.24). Чтобы избежать появления «паразитных» пиков, для приготовления основы (водно-солевого буфера) следует применять бидистиллированную воду и особо чистые неорганические соли (к примеру, двукислый фосфат калия или фосфорную кислоту).

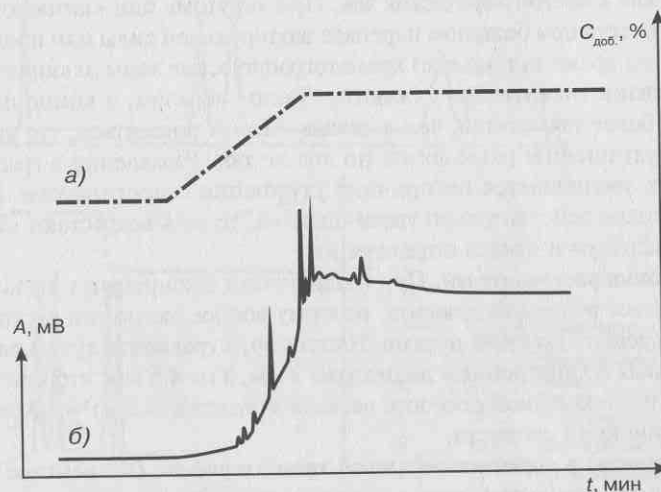


Рис. 2.24. Вид базовой линии (б) на подъеме градиента (а) при применении «грязных» растворителей

МС-АНАЛИТИКА
TEXTRONICA AG

www.textronica.com
+7 (495) 995 88 90
+7 (495) 937 96 33



НОВЫЕ КНИГИ



Х. Хенке

Жидкостная хроматография

Москва: Техносфера, 2008. — 264с., ISBN 978-5-94836-198-7

Автор приводит описание методов жидкостной хроматографии, разработанных на основе собственного многолетнего опыта. В книге рассмотрены следующие темы: аналитическое и препаративное разделение; хроматографические разделительные системы; практические примеры разделения; препаративное разделение комплексных смесей веществ; анализ следовых количеств; аналитика полимера; правила анализа. Наиболее важная информация подтверждается конкретными примерами.

Книга представляет собой отличное справочное пособие для специалистов по очистке и выделению различных веществ в лабораториях препаративной органической химии

Оглавление:

ПРЕДИСЛОВИЕ

ВВЕДЕНИЕ

ГЛАВА 1. Аналитические разделения

ГЛАВА 2. Препаративное разделение

ГЛАВА 3. Хроматографические разделительные системы

ГЛАВА 4. Примеры разделения из практики

ГЛАВА 5. Препаративное разделение сложных смесей веществ

ГЛАВА 6. Определение следовых количеств - следовый анализ

ГЛАВА 7. Аналитика полимеров

ГЛАВА 8. Аналитические и препаративные разделения

ГЛАВА 9. Инструкция по проведению анализов

СОКРАЩЕНИЯ И СИМВОЛЫ

ЛИТЕРАТУРА

СПИСОК ФИРМ

Переводное издание, формат 70x100/16, переплет

ИНФОРМАЦИЯ О НОВИНКАХ:
www.technosfera.ru

Как заказать наши книги?

По почте: 125319 Москва, а/я 91

По факсу: (495) 9563346

E-mail: knigi@technosfera.ru

sales@technosfera.ru





**Инновационные
растворители
и реагенты
для жидкостной
хроматографии**

Высокая химическая чистота и низкий уровень примесей обеспечивают наилучшую защиту для колонок и детекторов, исключительное УФ-пропускание, высокое качество пиков и минимальный дрейф



Специально разработанные растворители и реагенты для препаративных задач обеспечивают максимальную рентабельность промышленной хроматографии.



Идеальны для хроматографии сверхвысокого давления с масс-спектральным детектированием, для градиентной и изократической хроматографии с любым детектором.



ФЛП
ФизЛабПрибор

ФизЛабПрибор

- Расширенный диапазон и высокий коэффициент пропускания для УФ и флюоресценции.
- Низкий уровень ионного фона (<100 ppb щелочного металла).
- Общий органический углерод <10 ppb.
- Сопротивление >18.2 МΩ*см.
- Фильтрация через 0.1 мкм мембрану.
- Упаковка в стерильных условиях под инертным газом.
- Очень маленький остаток после выпаривания.

Тел./факс: (945)727-3121,
Тел.: (495)740-5406

E-mail: info@fizlabpribor.ru www.fizlabpribor.ru

Крайне сложно осуществить градиентное элюирование, если «слабый» элюент содержит какие-либо модифицирующие добавки, поглощающие свет в УФ диапазоне: триэтиламин, гептилсульфонат, уксусную кислоту и т.д.

Все элюенты для градиентного элюирования необходимо предварительно дегазировать, даже если насосная система содержит встроенный он-лайн дегазатор. Растворенный воздух активно выделяется при смешивании элюентов, что приводит к увеличению шумов на участке подъема градиента.

2.5. Выбор растворителя для приготовления пробы

Для приготовления пробы следует применять растворители, обладающие по возможности наименьшей элюирующей силой. В этом случае мы минимизируем размывание хроматографической зоны на входе в колонку и улучшаем эффективность разделения, особенно для слабо удерживаемых компонентов (см. рис. 2.25). В теории, наилучшим растворителем можно считать основу элюента, вполне удовлетворительным — сам элюент.

Но растворитель для приготовления пробы должен в том числе обеспечивать достаточную растворимость всех ее компонентов. Допустим, мы получаем жидкую пробу, переводя сухой остаток в небольшой объем жидкости. Лучшим является вариант, когда твердое вещество растворяется быстро и количественно, а полученная проба полностью прозрачна, без следов механических примесей и опалесценции. Далеко не всегда элюент, и особенно основа, обладают подобной хорошей растворяющей способностью.

Пусть мы проводим обращенно-фазовое определение. Вода или водно-солевые буферы (основа элюента) пригодны для растворения лишь наиболее полярных, водорастворимых соединений. В целом, лучшей растворяющей способностью обладают смеси воды с органическими растворителями, они пригодны для растворения достаточно неполярных соединений. Однако, чем выше доля органического растворителя, тем выше и элюирующая сила, со всеми вытекающими последствиями — то есть уширением пиков слабо удерживаемых компонентов (см. рис. 2.25б). Если взять для растворения сухого остатка достаточно вязкую смесь воды с изопропанолом или диметилформамидом (ДМФА), то картина может еще сильнее ухудшиться (см. рис. 2.25в): пики могут дополнительно ушириться, а их форма исказиться. Но зато смесь вода-ДМФА — это отличный универсальный растворитель. Что же делать? Как обычно, искать компромисс.

МС-АНАЛИТИКА

TEXTRONICA AG

4-2090

www.textronica.com

+7 (495) 995 88 90

+7 (495) 937 96 33

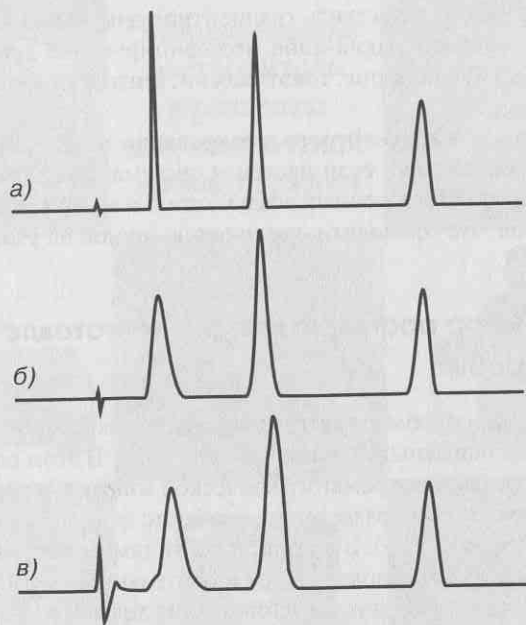


Рис. 2.25. Вид хроматограммы при вводе пробы в растворителе с элюирующей силой, равной (а) и большей (б, в) элюирующей силы элюента. В случае (в) вязкость растворителя пробы значительно отличается от вязкости элюента

Для хроматографистов, которые не могут позволить себе долгих экспериментов, могу дать три простых и практичных совета по подбору растворителя для приготовления пробы.

Первый совет. Помните, что растворитель пробы по составу должен быть по возможности ближе к применяемому элюенту. Если элюент представляет собой смесь водно-солевого буфера (основа) и ацетонитрила (добавка), то пробу лучше перерастворить в такой же смеси. Единственно, соотношение основы и добавки может быть другим. К примеру, если определяемые вещества достаточно неполярны, долю добавки в растворителе пробы можно увеличить. Но, опять же, не настолько, чтобы это привело к значительному ухудшению разделения.

Бывает, что аналиты плохо растворяются при pH основы элюента. К примеру, некоторые органические кислоты хорошо растворимы лишь в горячей «защелоченной» воде. В этом случае «щелочной» раствор кислот надо довести до комнатной температуры и погасить щелочь кислотой,

доведя pH раствора до pH основы элюента (к примеру, pH 2,5). Если основа также содержит какие-либо модифицирующие добавки (триэтиламин или ион-парные реагенты), раствор аналитов можно смешать с основой элюента, к примеру, в соотношении 1 : 1.

Второй совет. Допустим, мы хотим получить пробу растворением сухого остатка (на дне пробника) в небольшом объеме, микролитров 200, подходящего растворителя. Растворитель, как и элюент, состоит из основы и добавки.

К примеру, мы проводим обращенно-фазовое определение, и основа — это водно-солевой буфер, а добавка — ацетонитрил. Если мы определяем неполярные, плохо растворимые в основе элюента соединения, то сначала дозируйте в виалу аликвоту ацетонитрила. Воспользуйтесь шейкером или ультразвуком, чтобы ускорить растворение. Затем дозируйте в пробник аликвоту водной основы. Еще раз примените шейкер или ультразвук. Измерьте конечный объем пробы дозирующим шприцем (помните, что игла шприца должна быть предварительно заполнена жидкостью, к примеру, элюентом).

Если мы определяем водорастворимые, полярные соединения, то сначала дозируйте в пробник аликвоту водно-солевой буфера и только затем ацетонитрил. То есть повторите описанную выше процедуру при обратном порядке добавления компонентов растворителя.

Эта рекомендация пригодна и для нормально-фазовой хроматографии. Если определяемые соединения достаточно полярны, то сначала в виалу с сухим остатком лучше переносить аликвоту полярной добавки и лишь потом полученный раствор разбавлять неполярной основой.

Третий совет. Размывание хроматографических зон на входе колонки в первом приближении зависит от соотношения объема пробы к объему адсорбента в колонке. Чтобы уменьшить размывание, можно работать на большой колонке и/или вводить меньший объем пробы.

К сожалению, более точную рекомендацию здесь дать трудно. Все зависит от конкретного случая. Просто помните, что если по причине ввода пробы в растворителе высокой элюирующей силы появляется проблема значительного уширения пиков в начале хроматограммы, то проблему можно попробовать решить экстенсивно: взять колонку с большим диаметром, длиной или ввести меньший объем пробы.

ГЛАВА 3

ОБРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ДАННЫХ

3.1. Базовая линия.

Высокочастотные и низкочастотные шумы.

Сжатие и сглаживание хроматограммы.

Отношение сигнал/шум.

Предел детектирования (LOD) и предел определения (LOQ). Дрейф базовой линии

Базовой линией (baseline) называется линия фоновых сигнала детектора. Ее ход очевиден, когда никакие компоненты не элюируются с колонки: в этом случае сигнал детектора как раз и является фоновым, то есть детектор прописывает ни что иное, как базовую линию.

На практике фоновый сигнал детектора не выглядит как абсолютно гладкая линия. Как и любой сигнал от электронного устройства, он имеет *шумы*. Шум, по сути, и определяется как отклонение показаний детектора в одну и другую сторону от базовой, то есть средневзвешенной, линии (при отсутствии сигналов элюирующихся веществ).

Амплитуда шума, определенного таким образом, во многом зависит от выбора промежутка времени, в течение которого проводится измерение. Если промежуток времени выбрать сравнительно небольшим, к примеру, порядка секунды и менее, мы будем наблюдать *высокочастотные шумы*. Если задать промежуток времени равным нескольким секундам или более, то будет наблюдаться сумма высокочастотных и низкочастотных шумов. Все сказанное, разумеется, справедливо лишь в том случае, когда установленное время получения сигнала от детектора, или *постоянная времени* (TC, time constant), значительно меньше промежутка времени, в течение которого проводится наблюдение — иначе никаких шумов мы попросту не увидим.

Шум является нежелательным явлением; высокая амплитуда шумов приводит к уменьшению чувствительности анализа (увеличению предела определения целевых соединений). Соответственно, может возникнуть

вопрос: почему бы не установить на детекторе такое достаточно высокое значение постоянной времени, чтобы, по крайней мере, избавиться от высокочастотных шумов? В принципе, довольно часто так и поступают, то есть устанавливают постоянную времени вручную в диапазоне порядка от 0,5 до 1 с, не придавая этому параметру большого значения. Такой вариант вполне приемлем, если времена элюирования всех целевых соединений составляет не менее 15 с. В этих случаях каждый пик описывается не менее чем 15-ю точками (15 с разделить на 1 с), что вполне приемлемо для нормальной повторяемости площадей пиков и других его параметров.

Но допустим, что на хроматограмме, выполненной в изократическом режиме, присутствуют несколько пиков аналитов, которые значительно удалены друг от друга; ширина первого пика составляет 3 с, а последнего — 30 с. Если постоянную времени выбрать оптимально для последнего пика (TC = 1,5 с), то на первый пик придется всего 2 точки — то есть его можно просто не увидеть. С другой стороны, если оптимизировать постоянную времени под первый пик (TC = 0,15 с), то мы столкнемся сразу с двумя негативными эффектами. Так, последний пик, если он невысокий, может попросту «утонуть» в высокочастотных шумах (при равной площади последнего пика будет на порядок ниже первого). Кроме того, для описания последнего пика будет использовано 200 точек, что достаточно расточительно в плане объема памяти, необходимого для записи хроматограммы.

Последний фактор может приобрести большое значение при применении детектирования на нескольких каналах. Конечно, вряд ли большие файлы будут представлять неудобство в плане их архивирования — современные жесткие диски могут быть очень вместительными (терабайты). Но определенные проблемы могут появиться с передачей файлов по внутренней сети, по Интернету и даже с помощью флэш-накопителей. Кроме того, на обработку больших файлов тратится больше времени, что на слабом по конфигурации компьютере будет, вероятно, заметно.

На некоторых версиях программного обеспечения (ПО) для сбора и обработки хроматографических данных эта проблема решается следующим образом. Сначала получают хроматограмму — при минимальном значении постоянной времени и без применения каких-либо фильтров шумов. Далее оператор производит предварительную разметку пиков (или же это делается автоматически). Далее программа определяет оптимальное количество точек для каждого диапазона и, основываясь на определенном алгоритме, «выкидывает» лишние точки. Это процедура называется *сжатием хроматограммы*. Сжатие позволяет значительно снизить уровень высокочастотных шумов.

После сжатия уровень шума можно снизить путем применения различных *фильтров шумов*. Эта процедура называется *сглаживанием хроматограммы*. Некоторые ПО позволяют выбирать между различными типами фильтров. В любом случае, какой бы фильтр ни использовался, необходимо помнить, что чрезмерное сглаживание в определенный момент приводит к заметному искажению параметров пика: либо увеличению ширины, либо появлению «провала» у основания (в зависимости от типа применяемого фильтра) и т.д. При использовании процедуры сглаживания необходимо руководствоваться здравым смыслом и не допускать искажения градуировки или уменьшения повторяемости из-за недопустимо большого числа циклов сглаживания.

Амплитуда шума определяется как разница между его верхней и нижней границами. Отношение высоты пика к амплитуде шума называется *отношением сигнал/шум* и здесь обозначается как SN (вместо общепринятого S/N , поскольку косая дробь в обозначении может внести путаницу в формулы). Высота пика (иначе — сигнал) считается от верхней границы шума до самого верхнего значения в максимуме пика.

Отношение сигнал/шум является важной характеристикой пика (подразумевается, что SN определяется после процедур сжатия и сглаживания хроматограммы). Считается, что условием надежного детектирования вещества является 3-кратное превышение амплитуды шума сигналом. Концентрацию компонента в пробе, при которой в выбранных условиях для пика данного компонента достигается $SN = 3$, называют *пределом детектирования* (limit of detection, LOD) этого компонента.

Условием адекватного количественного определения является 10-кратное превышение амплитуды шума сигналом от компонента, $SN \geq 10$. Концентрация компонента в пробе, при которой в выбранных условиях достигается $SN = 10$, называют *пределом определения* (lowest limit of detection, LLOQ) этого компонента.

При одинаковой величине сигнала двух детекторов для одной и той же пробы лучшие пределы детектирования и определения достигаются на детекторе с меньшей амплитудой шума.

Кроме высокочастотных шумов, иногда на хроматограмме можно наблюдать низкочастотные шумы с характеристическим временем от секунд до десятков секунд. Нередко они имеют явно выраженный периодический характер. Наличие таких шумов свидетельствует о том, что в жидкостной системе хроматографа не все в полном порядке. Чаще всего причиной их появления является нестабильная работа насоса. При высокой амплитуде низкочастотного шума количественный анализ может стать очень затруднительным, а для слабых сигналов — попросту невозможным (см. рис. 3.1б).

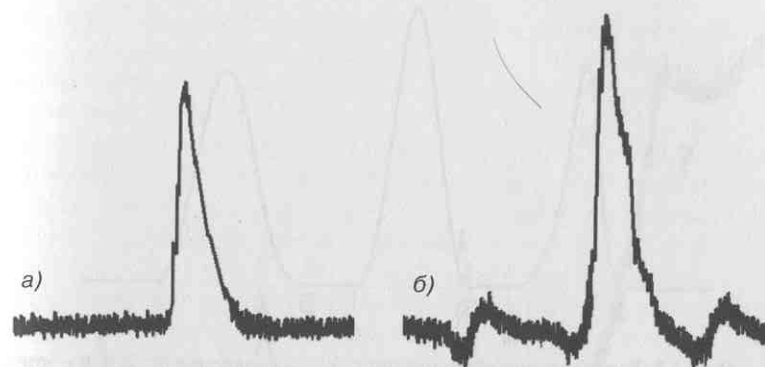


Рис. 3.1. Пик (сигнал) с отношением сигнал/шум $SN = 10$ на фоне высокочастотного шума (а) и на фоне высокочастотного и низкочастотного (б) шумов

Если причиной периодического шума является насосная система, для начала можно постараться промыть ее применяемым элюентом на повышенной скорости около 5 мл/мин при открытом клапане на слив. Это процедура способствует удалению из жидкостной линии небольших пузырьков воздуха. Очень важно, чтобы элюент, в первую очередь на водной основе, был тщательно дегазирован.

Если такая простая мера не помогает, систему необходимо промыть более тщательно, в том числе дистиллированной водой (см. разд. 2.3). В случае неудачи терапевтического подхода насосом следует заняться вплотную: заменить уплотнения, возможно фильтры, промыть сапфировые шарики на клапанах. Если работа ведется с элюентами на основе гексана, при замене уплотнений предварительно удостоверьтесь, что материал уплотнений совместим с неполярными растворителями.

Отклонение базовой линии от горизонтального хода называется *дрейфом*. Причины дрейфа, то есть изменения фонового сигнала детектора, могут быть различными. Одна из причин — изменение состава элюента при градиентном элюировании. Некоторые детекторы настолько к этому чувствительны, что совершенно непригодны для проведения любых градиентов (к примеру, рефрактометрический детектор). Спектрофотометрические детекторы в этом смысле вполне пригодны для проведения градиентного элюирования. При соблюдении требований к чистоте растворителей (см. разд. 2.4) градиентное элюирование приводит к умеренному дрейфу. Величина дрейфа зависит от длины волны: она меньше для длинных и больше для коротких (< 230 нм) длин волн поглощения.

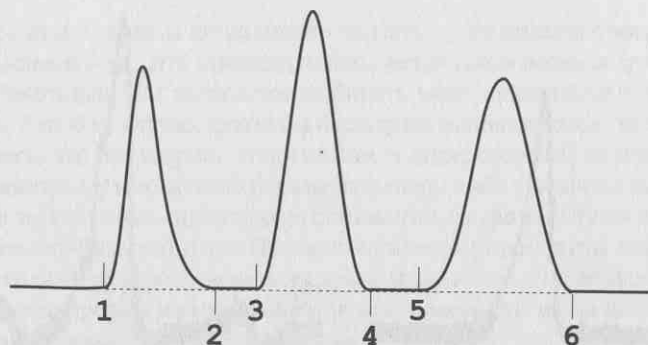


Рис. 3.2. Варианты разметки пиков: 1, 3, 5 — начало пиков; 2, 4, 6 — концы пиков

Как уже, наверное, стало ясно из такого предисловия, дрейф — это явление нежелательное. Дрейф способен сильно затруднить количественный анализ. Чтобы понять почему, рассмотрим следующую ситуацию.

Допустим, никакого дрейфа нет. На фоне абсолютно ровной базовой линии детектор прописывает пик. Для количественного анализа необходимо определить его площадь (также говорят — *проинтегрировать* пик, или *провести интегрирование*). В свою очередь, для определения площади надо провести *разметку* пика: отметить его начало и конец — и тогда программа сама проведет линию между ними (называется основанием пика). Эта линия, по сути, является не чем иным, как нашей догадкой о ходе базовой линии в момент выхода пика (см. рис. 3.2). Если дрейфа нет, то мы автоматически предполагаем, что и в момент выхода пика фоновый сигнал не изменяется: основание является просто продолжением базовой линии, то есть горизонтальным прямым отрезком (см. рис. 3.3а).

В этом случае не возникает никаких затруднений в определении начала и конца пика. Соответственно, и погрешность интегрирования оказывается минимальной — а это, собственно, и нужно для правильного количественного анализа. В принципе, то же можно сказать о ситуации с умеренным линейным дрейфом (см. рис. 3.3б), только основание там уже является не горизонтальной, а наклонной прямой.

Теперь допустим, что пик начал прописываться при горизонтальной базовой линии на одном уровне, а закончил прописываться также при горизонтальной базовой, но уже на другом уровне (см. рис. 3.3б). Здесь мы имеем дело с довольно неприятным видом дрейфа: базовая линия «под пиком» выглядит как ступенька. Даже если провести холостой анализ и получить *бланк* хроматограммы (то есть мы непосредственно увидим ход

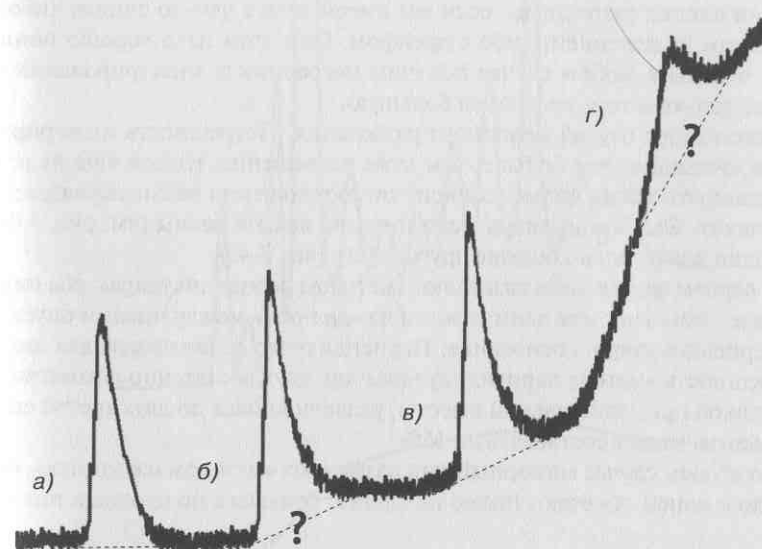


Рис. 3.3. Пик (сигнал) с отношением сигнал/шум $SN = 10$ на фоне высокочастотного шума при отсутствии дрейфа базовой линии (а), при дрейфе «ступенью» (б), умеренном линейном (в) и сильном линейном дрейфе (г)

базовой линии в данных условиях хроматографирования) — все равно это не поможет правильно разметить пик и может не позволить определить его площадь с требуемой точностью. Причина заключается в том, что нам будет непонятно, где именно установить конец пика, чтобы допустить минимальную погрешность интегрирования (см. рис. 3.3б). Также проблематичен и случай сильного линейного дрейфа: здесь уже могут появиться затруднения с определением и конца, и начала пика (см. рис. 3.3г). Борьбаться с этой проблемой каким-либо расчетным путем невозможно. Надо уменьшать дрейф, устраняя причину его появления.

3.2. Разметка хроматограммы

Разметкой будем называть определение начала пика и конца пика для всех интересующих нас пиков на хроматограмме. Разметка не представляет сложностей, если все пики аналитов хорошо разделяются, а дрейф базовой линии пренебрежимо мал (см. рис. 3.2). Если же эти условия не выполняются, то возникают определенные трудности.

Они вполне разрешимы, если мы имеем дело с чем-то одним: либо с неполным разделением, либо с дрейфом. При этом надо хорошо понимать, что мы в любом случае получим погрешность интегрирования — вопрос только в том, насколько большую.

Рассмотрим случай неполного разделения. Погрешность интегрирования, очевидно, тем больше, чем хуже разрешение. Но это еще не все. Погрешность также сильно зависит от соотношения высот неразделенных пиков. Она минимальна, если пики по высоте равны (см. рис. 3.4а) или один значительно больше другого (см. рис. 3.4б).

В первом случае пики разделяют «методом перпендикуляра»: оба пика вначале размечают как один, а затем из «долины» между пиками опускают перпендикуляр на основание. Перпендикуляр делит пик на два пика. Погрешность «метода перпендикуляра» для двух достаточно симметричных пиков примерно равной высоты, разделившихся до двух третей своей высоты, может составлять до 15%.

Во втором случае минорный пик размечают «методом наездника»: его начало и конец отмечают прямо на фронте большого по площади пика.

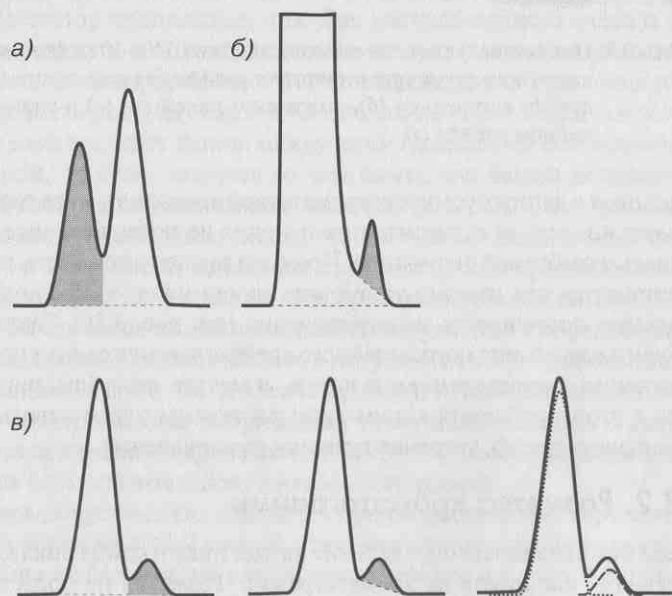


Рис. 3.4. Различные методы разметки не полностью разрешенных пиков: метод перпендикуляра (а), метод наездника (б), метод аппроксимации (в, рисунок справа)

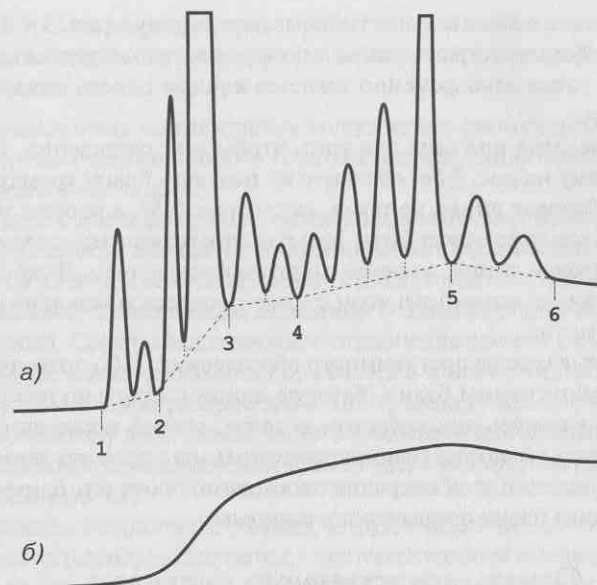


Рис. 3.5. Разметка участка хроматограммы на фоне дрейфа базовой линии сложной формы: хроматограмма (а) и бланк (б)

Максимальная погрешность интегрирования получается в том случае, когда один пик в несколько раз больше другого (см. рис. 3.4а). В этом случае «метод перпендикуляра» дает для минорного пика завышенный результат, а «метод наездника» — заниженный. Удовлетворительные результаты интегрирования в этой ситуации можно получить только при использовании «метода аппроксимации», который, к сожалению, реализован не во всех программах обработки хроматографических данных.

Теперь рассмотрим задачу разметки на сложной хроматограмме из многих пиков, причем на фоне дрейфа базовой линии (см. рис. 3.5а). В принципе, здесь очень желательно сначала провести холостой анализ и получить бланк хроматограммы, чтобы представлять себе ход базовой линии (см. рис. 3.5б).

Разметку надо проводить так, чтобы основания пиков сливались в ломаную линию, которая по форме как можно более точно повторяет базовую линию на бланке. При этом полученная «искусственная» базовая линия не должна пересекать долин между пиками, то есть при разметке не должно получаться отрицательных пиков. Так, например, хроматограмму на рис. 3.5а из двенадцати пиков можно разметить, проведя между шестью

точками пять оснований и опустив семь перпендикуляров ($5 + 7 = 12$). На приведенной хроматограмме пики элюируются прямо друг за другом, так что каждая точка одновременно является концом одного пика и началом следующего.

Есть еще одна причина для того, чтобы при разделении, подобном приведенному на рис. 3.5а, обязательно получать бланк хроматограммы. Допустим, базовая линия не такая, как на рис. 3.5б, а вообще абсолютно ровная — такое тоже может быть. Только в этом случае мы имеем дело не с дрейфом базовой линии, а просто с плохим разделением. Даже самая лучшая разметка не позволит в этом случае провести правильный количественный анализ.

Некоторые версии программного обеспечения (ПО) позволяют вычитать из хроматограммы бланк (базовую линию), отдельно полученный и внесенный в память при холостом анализе; можно также дать команду ПО записывать все последующие хроматограммы с вычетом данного бланка. При проведении этой операции необходимо проявлять бдительность — следить, чтобы бланк оставался постоянным.

3.3. Основы качественного анализа.

Способы идентификации соединений.

Арбитражный метод.

Ложноположительный и ложноотрицательный результаты идентификации

Задача качественного анализа состоит в том, чтобы ответить на вопрос: «Содержится ли данное вещество в пробе?» Как правило, после этого вопроса добавляют закономерное «... в концентрации, равной или большей предела детектирования данным аналитическим методом». Результат качественного анализа может быть положительным (вещество обнаружено) и отрицательным (вещество не обнаружено).

В хроматографии решение задачи качественного анализа начинается со сравнения времен удерживания пиков на хроматограмме образца со временем удерживания чистого аналита, который называют *стандартом*, а его раствор — *стандартным образцом*.

Совпадение времен удерживания для пиков аналита и его стандарта в рамках определенного диапазона, заложенного в методике, является необходимым условием положительного результата качественного анализа — но не достаточным. Более того, при правильно разработанной процедуре анализа (отсутствии потерь аналита в процессе инструментального ана-

лиза и/или на стадии подготовки пробы) необходимым и достаточным условием отрицательного результата является отсутствие пика аналита на хроматограмме.

Определенных комментариев заслуживают формулировки «совпадение времен удерживания» и «в рамках определенного диапазона, заложенного в методике».

Начнем с последней. Если вводить в хроматограф чистый стандарт, то повторяемость времен удерживания может быть весьма хорошей — особенно если применяемая хроматографическая система в результате специального исследования, валидации (validation), признана устойчивой (robust). Среднеквадратическое отклонение времен удерживания в этом случае может составлять порядка 0,2% и менее. Однако, при анализе реальных проб разброс значений t_R может сильно увеличиться. Именно поэтому в методиках часто закладывают значительно больший диапазон допустимых значений времен удерживания, как правило, от 2 до 5% (см. рис. 3.6).

Наиболее неприятный эффект, затрудняющий поиск пика аналита на хроматограмме, заключается в систематическом смещении времен удерживания в течение значительного промежутка времени — в сторону увеличения (реже) или уменьшения (чаще). В этом случае хроматографисты говорят, что пики «плывут». Этот эффект связан с посредственной устойчивостью применяемых хроматографических систем.

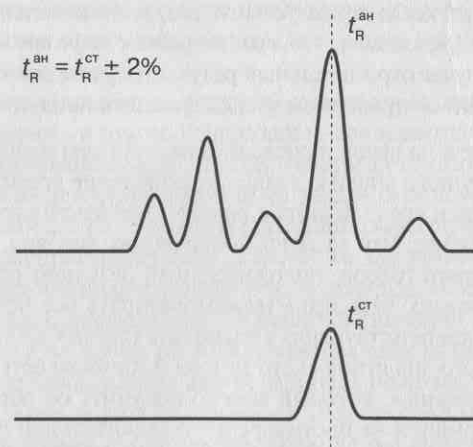


Рис. 3.6. Сравнение времен удерживания для пика на хроматограмме и для пика стандарта

Возможное «косметическое» решение проблемы заключается в применении относительных времен удерживания (то есть, строго говоря, селективностей). За репер часто принимают наиболее высокий пик, который в среднем смещается в той же степени, как и остальные пики на хроматограмме. При серьезном подходе от применения недостаточно устойчивых систем надо отказываться и искать другие условия разделения.

Теперь о формулировке «совпадение времен удерживания». Существует метод, который позволяет однозначно подтвердить отрицательный результат анализа, исходя только из времени удерживания. Допустим, в небольшой области хроматограммы, где следует ожидать появления пика аналита, никаких сигналов нет: прописывается ровная базовая линия. Тогда в пробу необходимо добавить стандартный раствор аналита в количестве, необходимом для его уверенного детектирования, и произвести повторный анализ. Если пик аналита появляется строго в ожидаемом месте и не сливается ни с одним из пиков, находящихся около рассматриваемой области — значит, результат анализа однозначно отрицательный: искомого соединения в исходной пробе не было.

Таким образом, для проверки отрицательной гипотезы необходимо произвести дополнительный анализ пробы с добавкой стандарта. Для принятия решения, — следует ли проводить эту процедуру в конкретном случае, — специалист должен руководствоваться здравым смыслом или методикой, если текст методики включает соответствующие указания. В общем случае, проверку отрицательной гипотезы следует проводить тогда, когда отрицательный результат является неожиданным. Грубо говоря, представим, что в растворимом кофе мы не нашли кофеина. В этом случае отрицательный результат лучше доказать, поскольку он может являться признаком фальсификации продукта.

Как было замечено выше, необходимым условием положительного результата качественного анализа является совпадение времен удерживания для пиков аналита и его стандарта в рамках определенного диапазона, заложенного в методике. Что касается достаточного условия, то здесь ситуация сложнее. Строго говоря, положительный результат однозначно подтвердить невозможно. Мы лишь можем собирать все больше и больше доказательств, свидетельствующих в его пользу. Однако, во-первых, для данного применяемого аналитического метода и прибора есть определенный максимум информации, который можно получить об образце. Если вся собранная информация не противоречит положительной гипотезе, то положительное заключение можно представить, к примеру, в следующей формулировке: «На основании результатов измерения, полученных с помощью [применяемый метод] на приборе [тип и конфигурация прибора] согласно

методике [номер и название методики], сделано заключение, что [название аналита] соединение присутствует в пробе номер [шифр пробы]».

Во-вторых, при проведении, к примеру, серийных анализов определенного типа образцов, как правило, не возникает серьезного повода сомневаться в присутствии искомого соединения в пробе. Разумеется, это не значит, что разработчик методики должен проявлять легкомыслие при ее валидации: защита от ложноположительного результата должна быть достаточно надежной. Но, в то же время, эта защита не должна быть избыточной и сильно усложнять методику — везде нужна мера.

Далее в этом разделе мы будем рассматривать методы и приемы, которые применяют в жидкостной хроматографии для подтверждения положительной гипотезы качественного анализа; этот процесс называют *идентификацией*.

Итак, допустим, времена удерживания аналита и стандарта совпали. Что дальше? Здесь есть три варианта. Первый — пик действительно относится к аналиту. Второй — он относится к другому веществу с очень похожим временем удерживания. Третий вариант — мы видим наложение двух или большего числа пиков, один из которых принадлежит аналиту. Первое действие в процессе идентификации очень простое, но вместе с тем важное: внимательно посмотрите на форму пика на хроматограмме. Пик должен иметь неискаженную форму, близкую к гауссовой кривой. Если на пике есть видимые перегибы — это довод в пользу второго или третьего варианта. То есть мы наблюдаем наложение пиков, и качественный анализ провести не можем; для этого необходимо достичь лучшего разделения. Но, допустим, пик внешне не выглядит искаженным. Тогда переходим к следующему этапу.

Ряд детекторов позволяет получать *спектральные характеристики* пиков, которые можно и нужно использовать для идентификации. К подобным детекторам можно отнести: сканирующий фотометрический детектор, фотометрический детектор с диодной матрицей, сканирующий флуориметрический и наиболее селективный масс-спектрометрический детекторы.

Наиболее распространенным детектором для рутинных определений является сканирующий фотометрический детектор. «Сканирующий» обозначает то, что его дифракционная решетка способна поворачиваться и быстро «пробегать» набор позиций, отвечающих разным длинам волн. В результате, детектор прописывает сразу несколько хроматограмм — каждую на своей длине волны поглощения. Высота пика на различных длинах волн поглощения неодинакова. Отношение высоты пика на одной длине волны к высоте этого пика на другой длине волны называется *спектральным отношением*.

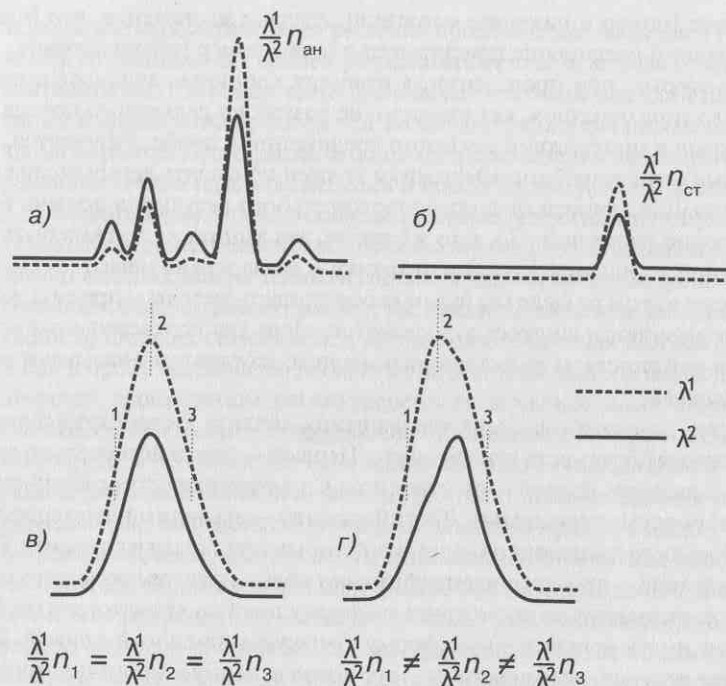


Рис. 3.7. Применение спектральных отношений: а – хроматограмма образца, б – хроматограмма стандарта, в – положительный результат теста на чистоту пика, г – отрицательный результат теста на чистоту пика (комментарии в тексте)

Спектральное отношение – это простейшая спектральная характеристика пика. Конечно, для ее хорошей воспроизводимости необходимо тщательно соблюдать постоянство всех параметров хроматографической системы и параметров разметки хроматограммы; необходимо также помнить, что повторяемость спектрального отношения будет ниже для пиков с меньшим отношением сигнал/шум. В целом, в качестве одной из возможных оценок для удовлетворительного совпадения спектральных отношений можно применять диапазон $\pm 10\%$.

Если у пика аналита и пика стандарта совпадают спектральные отношения (см. рис. 3.7а, б), то остается провести последнюю рутинную процедуру, связанную с идентификацией пика: *тест на чистоту пика* (purity test). Эта процедура доступна при применении сканирующего спектрофотометрического сканирующего флуориметрического, а также диодно-

матричного детекторов. Для диодно-матричного детектора, как правило, этот тест может быть проведен автоматически с помощью поставляемого программного обеспечения (ПО). К сожалению, ПО для сканирующих детекторов в большинстве случаев не содержат этой опции, и тест необходимо проводить вручную.

В принципе, ничего сложного здесь нет, поскольку тест основан на сравнении различных спектральных отношений в разных точках пика. При проведении теста вручную необходимо измерять спектральное отношение не только в точке максимума, но также в начале и в конце пика (см. рис. 3.7в, г). Если пик соответствует одному веществу, то значительной разницы между спектральными отношениями в разных точках пика быть не должно (см. рис. 3.7в).

Если все перечисленные процедуры пройдены успешно, то результат идентификации (на данном техническом уровне, при проведении серийных анализов) можно считать положительным.

При появлении сомнений в правильности идентификации можно провести дополнительные тесты. Во-первых, для идентификации можно применять не одно спектральное отношение, а сразу несколько их значений. Для этого необходимо получить хроматограммы на нескольких длинах волн (удобнее в этом плане диодно-матричный детектор, но сканирующий фотометрический также вполне применим).

Во-вторых, можно немного изменить селективность разделения, применяя, к примеру, колонку другого производителя (или каким-либо другим образом). Если целевое соединение действительно присутствует в пробе, все тесты, описанные выше, также должны дать положительный результат. Наиболее очевидный случай приведен на рис. 3.8: при изменении селективности системы стало очевидно, что пик 4, вначале принятый за аналит (см. рис. 3.8а), им не является (см. рис. 3.8б). В серьезных методиках вероятность наложения пиков примесей на пик аналита предусматривают заранее. Для этих случаев в тексте методик содержатся указания, как можно изменить параметры хроматографирования, чтобы получить разделение с альтернативной селективностью.

В любом случае, при наличии обоснованных сомнений в правильности идентификации (или количественного определения) можно прибегнуть к арбитражному методу. Для ВЭЖХ в качестве арбитражного метода применяют ВЭЖХ с масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС). Этот выбор достаточно обоснован, если только речь идет не о разделении изомеров. По моему мнению, в действительно хорошей методике должны указываться арбитражный метод и соответствующие условия разделения.

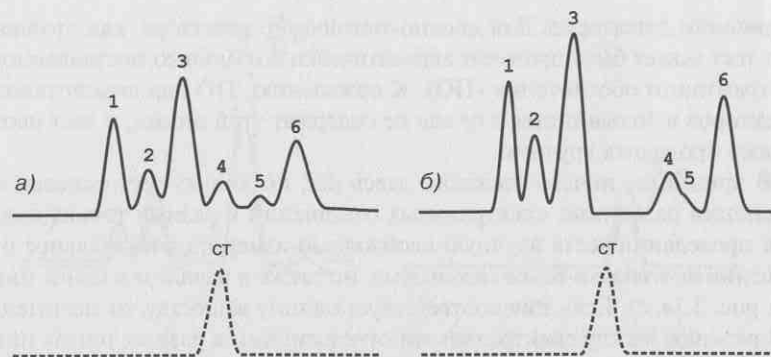


Рис. 3.8. Тест на ложноположительный результат идентификации при помощи изменения селективности системы: а – разделение при соблюдении основных условий, б – разделение в альтернативной системе с отличной селективностью

Если идентификация проводится с помощью спектрофотометрического диодно-матричного детектора, то появляется возможность просматривать в каждой точке пика УФ/Вид спектр в достаточно широком диапазоне, а не просто поглощение на двух (или нескольких) длинах волн. В сущности же, процедура идентификации принципиально ничем не отличается от описанной выше.

Основным преимуществом является большее удобство работы при разработке методик. Например, понять, что данный пик не является чистым пиком аналита, часто можно сразу, если его спектр даже визуально не похож на спектр стандарта (см. рис. 3.9). Другое преимущество: тест на чистоту пика автоматизирован; условная «чистота пика» выдается программой в процентах. Наконец, идентификацию можно также проводить автоматически, причем с применением всех спектральных отношений. Другими словами, программа сама сравнивает спектр пика и спектр стандарта и выдает коэффициент совпадения спектров в процентах. Какое совпадение считать удовлетворительным – должно быть указано в методике, либо это является решением аналитика. Основной недостаток диодно-матричного детектора – это цена: он примерно вдвое дороже сканирующего (у одного производителя).

Суммируя, можно сказать, что диодно-матричный детектор можно рассматривать как исследовательский вариант спектрофотометрического детектора. Например, хроматографы для рутинного анализа лучше оснащать сканирующими детекторами, а на прибор для отработки методик имеет смысл ставить диодно-матричный детектор.

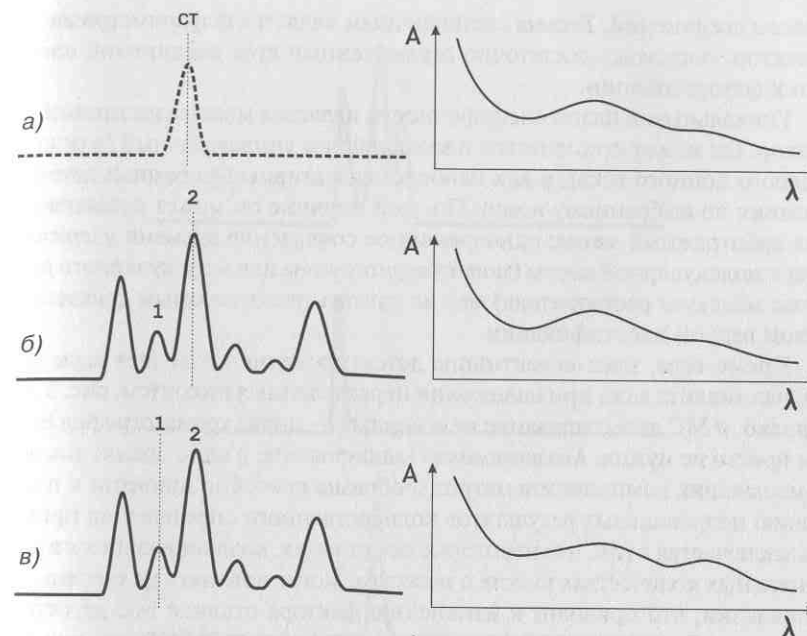


Рис. 3.9. Сравнение УФ спектра стандарта со спектрами двух пиков на хроматограмме: а – спектр стандарта; б – высокий уровень совпадения, в – низкий уровень совпадения

Несколько слов о такой важной характеристике вида детектирования, как специфичность. Под *специфичностью детектирования* будем понимать свойство, обратное универсальности: универсальные детекторы реагируют на присутствие любого соединения, а специфичный – только на определенную группу соединений или вообще на одно соединение. Часто в качестве синонима «специфичности детектирования» применяют термин «селективность детектирования», но мы не будем им пользоваться, чтобы не возникло путаницы с селективностью разделения.

Наиболее универсальными детекторами для ВЭЖХ являются рефрактометрический и испарительный детекторы светорассеяния. По ряду причин они применяются не очень часто. Промежуточное положение занимает спектрофотометрический детектор. С одной стороны, он достаточно универсален: большинство органических соединений, представляющих практический интерес, в том или иной степени поглощают свет в УФ области. С другой стороны, он обладает умеренной специфичностью, что в большинстве случаев позволяет различать по УФ/Вид спектру различные

классы соединений. Весьма специфичным является флуориметрический детектор, поскольку достаточно ограниченный круг соединений способен к флуоресценции.

Уникальным в плане специфичности является масс-селективный детектор. Он может применяться и как наиболее универсальный (в режиме полного ионного тока), и как наиболее селективный (в режиме детектирования по выбранному иону). По этой причине он может применяться как арбитражный метод: одновременное совпадение времени удерживания и молекулярной массы (молекулярного иона или молекулярного иона плюс молекула растворителя) можно считать очень весомым доказательством верной идентификации.

Кроме того, масс-селективное детектирование позволяет выделить сигнал аналита даже при наложении неразделенных пиков (см. рис. 3.10). Однако, и МС детектирование не всеильно — иначе хроматография была бы просто не нужна. Козлюирование (элюирование в одно время) аналита и мешающих компонентов матрицы образца способно привести к получению неправильных результатов количественного определения; причина заключается в том, что некоторые соединения, козлюирующиеся в значительных количествах вместе с целевым, могут повлиять на степень его ионизации, что приводит к изменению фактора отклика МС детектора на аналит. Более того, МС детектирование не способно помочь при попытке выделить сигнал аналита из неразделенной смеси изомеров, поскольку их МС-спектры часто практически идентичны.

В завершение главы о качественном анализе хотелось бы подробнее остановиться на причинах ложноположительной и ложноотрицательной идентификации.

Как уже отмечалось, никакой, даже самый надежный и специфичный, метод идентификации не дает 100%-ной гарантии ее правильности. Каждый раз, приписывая определенному пику химическое соединение с определенной структурной формулой, мы высказываем гипотезу — более или менее достоверную. Достоверность гипотезы растет пропорционально нашим знаниям об анализируемом образце и информативности выбранного метода идентификации.

Но вероятность ошибочной идентификации существует всегда. Ошибка может быть двух типов. Первый тип — когда соединение в образце присутствует, но оно не найдено. Этот результат анализа называют ложноотрицательным. Второй тип — когда соединения в образце нет, но оно в нем найдено. Такой результат анализа называют ложноположительным. Возникновение ошибок обоих типов в основном можно объяснить человеческим фактором.

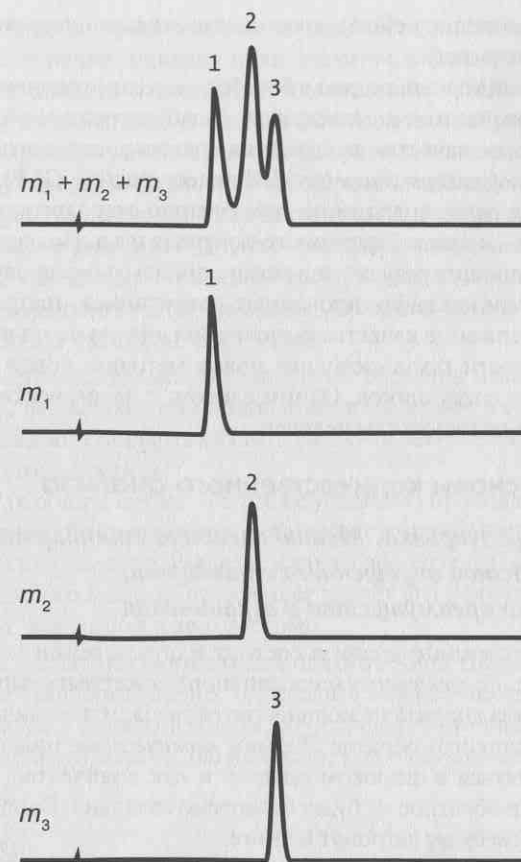


Рис. 3.10. Выделение сигнала аналита из тройки частично разделенных пиков неизомерных соединений (при применении масс-селективного детектирования)

Ложноотрицательные результаты, как правило, возникают при потере аналита в процессе отбора пробы и подготовки пробы для анализа. Ложноположительные результаты возникают в двух случаях: либо при ошибочной идентификации пика примеси как пика аналита, либо при попадании аналита в «чистую» пробу из какого-либо другого источника, например, предыдущей пробы, окружающей среды и т.д. Для случая, когда аналит попадает в «чистую» пробу из другой пробы, существует целый ряд названий, не имеющих, к сожалению, общепринятого аналога в русском языке:

эффект памяти (memory effect), кросс-контаминация (cross-contamination) и керри-овер (carry-over).

Единственный верный подход в борьбе с высоким уровнем ошибочных результатов — это подход комплексный. В лаборатории необходимо поддерживать высокое качество выполнения анализов, следовать принципам хорошей лабораторной практики (good laboratory practice, GLP). В это понятие включаются рекомендации по соблюдению стандартных норм, проведению внутри- и межлабораторного контроля и т.д. Но наивно было бы полагать, что хороших результатов можно добиться без продуманной системы мотивации квалифицированных сотрудников, направленной не только на поддержание качества выполнения анализов, но и на увеличение эффективности труда, освоение новых методик, новой техники, на обучение новых сотрудников. Одним словом, с человеческим фактором может справиться только сам человек.

3.4. Основы количественного анализа

3.4.1. Градуировка. Метод внешнего стандарта.

Метод внутреннего стандарта, его преимущества и ограничения

Задача количественного анализа состоит в определении концентрации аналита в пробе. Концентрация (concentration) может быть выражена в единицах количества аналита на количество образца, или количества аналита на объем (жидкого) образца. Термин «количество» (quantity, amount) будет употребляться в широком смысле: и как количество, и как масса вещества — если обратное не будет оговорено отдельно. Вопрос пересчета концентраций не будет затронут в книге.

В большинстве случаев конечные результаты анализов представляют в единицах массовой концентрации, то есть как массу определяемого вещества на единицу массы образца (см. табл. 3.1); в работе лучше применять российские обозначения: мг/кг, мкг/кг и т.д.

Таблица 3.1. Единицы массовой концентрации

Отношение массы аналита к массе образца	Международное обозначение единицы концентрации	Российское обозначение единицы концентрации
1 на 100	%	%
1 на 1 000 000	ppm	мг/кг, мкг/г
1 на 1 000 000 000	ppb	мкг/кг, нг/г
1 на 1 000 000 000 000	ppt	нг/кг, пг/г

В хроматографии решение задачи количественного анализа достигается путем сравнения площади пика аналита с площадью пика стандартного образца аналита известной концентрации. Установление соответствия между концентрацией аналита в стандартном образце и площадью его пика на хроматограмме в выбранных условиях называется градуировкой (в международном варианте — калибровка, calibration).

Существует два основных способа градуировки: один способ называется методом внешнего стандарта, другой — методом внутреннего стандарта.

Говоря о «внешнем» стандарте, подчеркивают, что анализ стандарта проводится отдельно от анализа пробы. Алгоритм метода внешнего стандарта достаточно прост (см. рис. 3.11а):

- 1) проводят анализ смеси стандартных образцов известной концентрации, размечают пики стандартов и измеряют их площади;
- 2) для каждого стандарта аналита рассчитывают значение абсолютного фактора отклика;
- 3) затем (в общем случае — в тех же условиях) проводят анализ пробы, размечают пики аналитов и измеряют их площади;
- 4) зная площадь пика аналита, а также абсолютный фактор отклика, для каждого аналита производят расчет его количества в аликвоте пробы, введенной в хроматограф.

Выведем расчетную формулу для одноточечной градуировки. В методе внешнего стандарта удобнее определять количество аналита $n_{ан}$, которое содержится в аликвоте пробы, непосредственно вводимой в хроматограф. Иногда это количество называют количеством вещества «в пике».

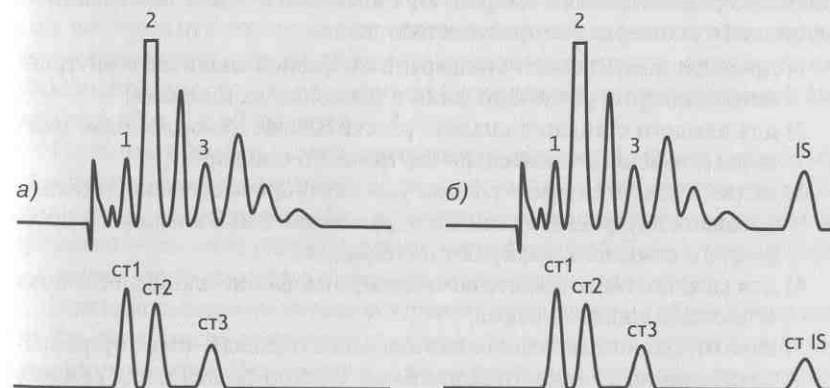


Рис. 3.11. К иллюстрации методов внешнего (а) и внутреннего (б) стандартов

Отношение количества аналита «в пике» к количеству стандарта «в пике» равно отношению площадей их пиков. Записываем это в виде пропорции:

$$n_{\text{ан}}/n_{\text{ст}} = S_{\text{ан}}/S_{\text{ст}},$$

где $n_{\text{ст}}$ — количество стандарта в объеме стандартного образца, введенного в хроматограф, $n_{\text{ан}}$ — количество аналита в объеме пробы, введенной в хроматограф, $S_{\text{ст}}$ — площадь пика стандарта, $S_{\text{ан}}$ — площадь пика аналита.

Соответственно, для каждого из аналитов на рис. 3.11а можно записать соответствующую формулу расчета:

$$\begin{aligned} n_{\text{ан}}^1 &= n_{\text{ст}}^1/S_{\text{ст}}^1 \times S_{\text{ан}}^1; \\ n_{\text{ан}}^2 &= n_{\text{ст}}^2/S_{\text{ст}}^2 \times S_{\text{ан}}^2; \\ n_{\text{ан}}^3 &= n_{\text{ст}}^3/S_{\text{ст}}^3 \times S_{\text{ан}}^3. \end{aligned}$$

Отношение $n_{\text{ст}}/S_{\text{ст}}$ называется *абсолютным фактором отклика* для данного аналита. В завершение рассчитывают количество аналита во всей приготовленной пробе: $N_{\text{ан}} = n_{\text{ан}} \times (V_{\text{пр}}/V_{\text{ал}})$, где $V_{\text{пр}}$ — объем всей пробы и $V_{\text{ал}}$ — объем аликвоты пробы, непосредственно введенной в хроматограф.

Теперь рассмотрим метод внутреннего стандарта. В нем, кроме аналитов и их стандартов, присутствует еще один (точнее, один по крайней мере) стандартный образец, который называют *внутренним стандартом* (internal standard, IS). При проведении анализа внутренний стандарт добавляют и в смесь стандартных образцов стандарта, и в пробу (см. рис. 3.11б); количество вносимого внутреннего стандарта, как правило, фиксировано. При проведении количественного определения площади пиков стандартов и аналитов сравниваются не напрямую, а косвенно — через площадь пика внутреннего стандарта. Алгоритм метода таков:

- 1) проводят анализ смеси стандартных образцов аналитов и внутреннего стандарта, размечают пики и измеряют их площади;
- 2) для каждого стандарта аналита рассчитывают *относительные факторы отклика* (относительно внутреннего стандарта);
- 3) затем (в общем случае — в тех же условиях) проводят анализ пробы с добавкой внутреннего стандарта, размечают пики аналитов и внутреннего стандарта, измеряют их площади;
- 4) для каждого пика аналита вычисляют отношение площади его пика к площади пика стандарта;
- 5) зная отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта, а также относительный фактор отклика, для каждого аналита сразу производят расчет его количества во всей приготовленной пробе.

Относительные факторы отклика для одноточечной градуировки определяются по следующим формулам (для каждого аналита на хроматограмме стандартов, см. рис. 3.11 внизу):

$$\begin{aligned} k_1 &= (S_{\text{ст}}^{\text{IS}}/S_{\text{ст}}^1) \times (N_{\text{ст}}^1/N_{\text{ст}}^{\text{IS}}); \\ k_2 &= (S_{\text{ст}}^{\text{IS}}/S_{\text{ст}}^2) \times (N_{\text{ст}}^2/N_{\text{ст}}^{\text{IS}}); \\ k_3 &= (S_{\text{ст}}^{\text{IS}}/S_{\text{ст}}^3) \times (N_{\text{ст}}^3/N_{\text{ст}}^{\text{IS}}), \end{aligned}$$

где k_1 — относительный фактор отклика для 1-го аналита, $S_{\text{ст}}^1$ — площадь пика стандарта 1-го аналита, $S_{\text{ст}}^{\text{IS}}$ — площадь пика внутреннего стандарта (на хроматограмме смеси стандартов), $N_{\text{ст}}^1$ — количество стандарта 1-го аналита во всем стандартном образце, $N_{\text{ст}}^{\text{IS}}$ — количество внутреннего стандарта во всем стандартном образце.

Формулы расчета для каждого аналита выглядят следующим образом:

$$\begin{aligned} N_{\text{ан}}^1 &= k_1 \times (N_{\text{ст}}^{\text{IS}}/S_{\text{ст}}^{\text{IS}}) \times S_{\text{ан}}^1; \\ N_{\text{ан}}^2 &= k_2 \times (N_{\text{ст}}^{\text{IS}}/S_{\text{ст}}^{\text{IS}}) \times S_{\text{ан}}^2; \\ N_{\text{ан}}^3 &= k_3 \times (N_{\text{ст}}^{\text{IS}}/S_{\text{ст}}^{\text{IS}}) \times S_{\text{ан}}^3, \end{aligned}$$

где $N_{\text{ан}}^1$ — количество 1-го аналита во всей приготовленной пробе, k_1 — относительный фактор отклика для 1-го аналита, $S_{\text{ан}}^1$ — площадь пика 1-го аналита, $S_{\text{ст}}^{\text{IS}}$ — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме образца, $N_{\text{ст}}^{\text{IS}}$ — количество внутреннего стандарта во всей пробе.

Как правило, $N_{\text{ст}}^{\text{IS}}$ и $N_{\text{ст}}^{\text{IS}}$ стараются подобрать таким образом, чтобы соответствующие им количества $n_{\text{ст}}^{\text{IS}}$ и n^{IS} , непосредственно вводимые в хроматограф, не слишком сильно отличались, то есть $n_{\text{ст}}^{\text{IS}} \approx n^{\text{IS}}$. Это делается для того, чтобы исключить возможность зависимости относительных факторов отклика от количества введенного в хроматограф внутреннего стандарта и, таким образом, увеличить точность определения. Максимально допустимым отличием (даже для детекторов с хорошей линейностью) $n_{\text{ст}}^{\text{IS}}$ и n^{IS} является 3–4 раза.

На первый взгляд, метод внутреннего стандарта может показаться сложным и даже надуманным. Зачем придумывать еще одно химическое соединение, которое мало того, что наряду с аналитами надо разделить от примесей — оно еще усложняет расчетную формулу? Дело в том, что метод внутреннего стандарта имеет два важных преимущества.

При использовании метода внутреннего стандарта ни объем вводимой пробы, ни точность ее дозирования никак не влияют на точность количественного анализа. Ведь какой бы объем пробы мы не ввели — отношение площадей пиков аналита и внутреннего стандарта останется постоянным. К тому же, в методе внутреннего стандарта мы оперируем сразу количе-

ствами веществ во всей приготовленной пробе, которые не зависят от объема вводимой в хроматограф аликвоты.

Для того, чтобы избежать только погрешности дозирования, внутренний стандарт вносят в пробу непосредственно перед ее анализом.

Второе преимущество метода внутреннего стандарта проявляется при наличии в методике стадий экстракции и/или подготовки пробы. Применение метода внутреннего стандарта дает возможность в каждом проводимом определении учитывать потери аналитов в процессе экстракции и подготовки пробы, а также контролировать степени извлечения аналитов на любой отдельно взятой стадии аналитической процедуры. В этом случае внутренний стандарт или стандарты вносятся на соответствующих стадиях извлечения и подготовки пробы. Подробно этому вопросу посвящен разд. 3.4.6.

Таким образом, для сравнительно простых случаев, когда отсутствует многостадийная подготовка пробы и/или когда вклад погрешности дозирования при вводе пробы в общую погрешность можно считать относительно малым (подробнее об этом — в разд. 3.4.2), выбор метода внешнего стандарта будет вполне обоснован. К примеру, мы определяем действующее вещество в жидком экстракте БАДа (биологически активной добавки). Стадия подготовки пробы отсутствует, то есть аналиты до ввода пробы в хроматограф нигде нельзя потерять. Кроме того, исследование проводится в широком диапазоне концентраций (высокой точности здесь не достигнешь), и, к тому же, БАД — не лекарственное средство: все свидетельствует о том, что в этом случае вполне достаточно задать погрешность метода не более $\pm 15\%$. В этом случае ничего более метода внешнего стандарта нам не требуется.

Как только в методике появляется стадия подготовки пробы — метод внутреннего стандарта становится предпочтительным: по-хорошему, никогда степень извлечения аналита не может быть, положим, $> 99\%$ и всегда стабильно воспроизводиться на этом уровне.

К сожалению, метод внутреннего стандарта хорошо реализуется только при наличии достаточно специфичного детектирования, поскольку пик внутреннего стандарта должен гарантированно отделяться от всех других пиков на хроматограмме. Соответственно, метод внутреннего стандарта удобнее применять при масс-селективном детектировании. Более или менее приемлемо и флуориметрическое детектирование. При спектрофотометрическом детектировании попытка реализовать метод внутреннего стандарта может закончиться неудачей, поскольку этот вид детектирования недостаточно специфичен.

Если мы собираемся применять внутренний стандарт для контроля степени извлечения аналитов при подготовке пробы, то он должен быть

(по возможности) структурно подобен аналитам и имитировать их поведение при экстракции, адсорбционной очистке и т.д.

Еще одно ограничение: химическое соединение, используемое как внутренний стандарт, принципиально должно отсутствовать в объекте анализа. Иногда бывает очень непросто подобрать такое вещество. В подобных случаях в качестве внутреннего стандарта применяют такие соединения, которые не встречаются в природе, например, фторсодержащие или изотопномеченные.

Конечно, ограничений у метода достаточно. Но только метод внутреннего стандарта (допустим, в сочетании с ВЭЖХ-МС техникой инструментального анализа) способен обеспечить высокую точность определений при сложных анализах, когда, допустим, целую группу аналитов, присутствующих в следовых концентрациях, необходимо определять в комплексных матрицах. К комплексным матрицам можно уверенно отнести биологические образцы, образцы продуктов питания и многие экологические образцы.

3.4.2. Погрешность измерения.

Случайная и систематическая погрешности.

Термины по ГОСТ ИСО 5725: точность (accuracy), правильность (trueness), прецизионность (precision), повторяемость (repeatability), воспроизводимость (reproducibility). Вычисление доверительного интервала. Источники случайной погрешности.

Вклад влияния шума детектора в общую погрешность измерения.

Источники систематической погрешности.

Что такое «неопределенность измерения»?

Перейдем непосредственно к метрологии. Как известно из философии (см. Приложение А), измеряется не явление, а параметры его модели. Согласно общепринятой (на данный момент) модели, у измеряемой характеристики имеется истинное значение. При попытке измерить истинное значение мы получаем некоторое экспериментальное значение x . Оно, однако, не равно истинному, а отличается от него на величину, которая называется погрешностью измерения (error). Если мы проведем много испытаний, то сможем вычислить среднее (арифметическое) экспериментальное значение $\bar{x}_{\text{ср}}$ — оно, собственно, и применяется в качестве оценки истинного значения. Разница между истинным и средним экспериментальным значениями

ми называют *систематической погрешностью*. Разницу между конкретным экспериментальным значением и средним экспериментальным значением называют *случайной погрешностью*.

При стремлении количества испытаний к бесконечности распределение экспериментальных значений вокруг среднего приобретает вид гауссовой кривой, то есть вид *нормального распределения* (см. рис. 3.12). Для нормального распределения мерой разброса экспериментальных значений является *среднеквадратичное отклонение*, *СКО*, или, в международном варианте, *стандартное отклонение* (standard deviation), которое обозначается как σ . СКО, возведенное в квадрат, называется *дисперсией* σ^2 .

Теперь для удобства изложения введем ряд терминов, соответствующих ГОСТ ИСО 5725. *Точностью* (accuracy) называется мера близости результата измерения к истинному значению. Более точный метод характеризуется

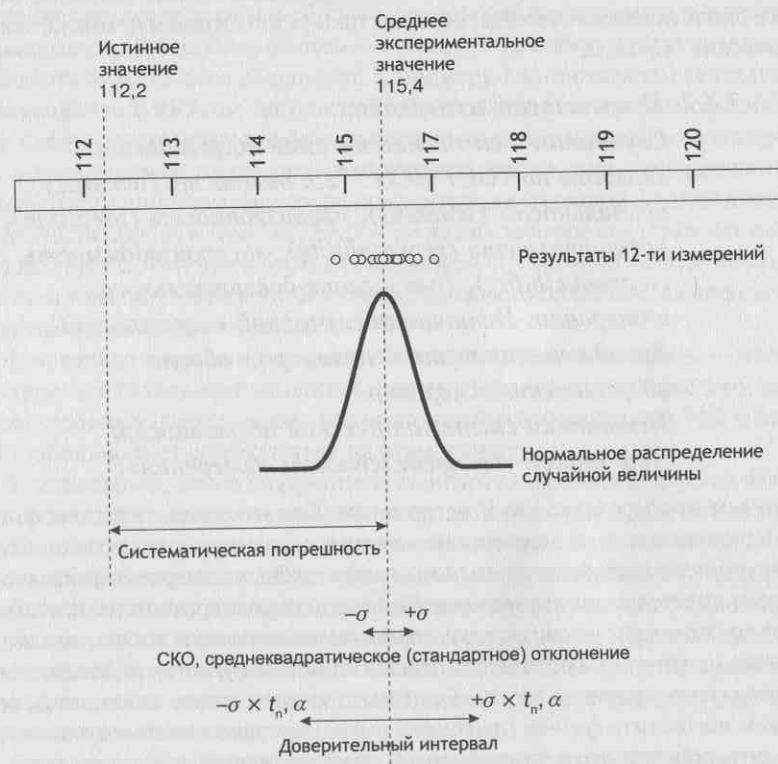


Рис. 3.12. Метрологические характеристики

как меньшей систематической погрешностью, так и меньшим разбросом экспериментальных значений. *Правильностью* (trueness) называется мера близости среднего экспериментального значения к истинному, то есть более правильное измерение характеризуется меньшей систематической погрешностью. *Прецизионностью* (precision) называется мера близости двух независимых результатов измерений, полученных в конкретно установленных условиях, то есть более прецизионное измерение характеризуется меньшим разбросом экспериментальных значений вокруг среднего. Таким образом, мы получаем, что, согласно принятой модели, точность измерения является суммой правильности и прецизионности.

В свою очередь, прецизионность также можно разложить на две составляющие: *повторяемость*, или *сходимость* (repeatability), и *воспроизводимость* (reproducibility). Термином «повторяемость» пользуются, говоря о разбросе значений в пределах одной выборки, а термином «воспроизводимость» — говоря о разбросе средних значений различных выборок, к примеру, результатов, полученных в различных лабораториях (при проведении межлабораторных испытаний).

Вернемся к рис. 3.12. Он имеет недостаток, который был внесен намеренно. Согласно рисунку истинное значение есть некоторое определенное значение. Но при попытке измерить его конкретным методом, — даже проведя бесконечное число испытаний, — мы получим лишь распределение, пусть даже сколь угодно узкое.

Так же, как и истинное значение, невозможно точно определить и систематическую погрешность (см. ее определение выше). Ее можно лишь уменьшить до определенного значения, которое поддается измерению.

Теперь вопрос: насколько широким нужно взять интервал вокруг среднего экспериментального значения, чтобы истинное значение с заданной вероятностью оказалось внутри этого интервала (он называется *доверительным интервалом*)? Строго говоря, на этот вопрос можно ответить только в том случае, когда систематическая погрешность сведена к минимуму, то есть когда точность измерения полностью определяется его прецизионностью. В этом случае для бесконечного числа испытаний ответ прост: доверительный интервал равен удвоенному СКО, то есть $\pm\sigma$ (см. рис. 3.12). На практике же, для вычисления доверительного интервала при данном числе испытаний n и заданной вероятности α величину СКО необходимо умножить на *коэффициент Стьюдента* $t(n, \alpha)$ (см. табл. 3.2)

Значение коэффициента Стьюдента $t(n, \alpha)$, а значит, и ширина доверительного интервала $\pm\sigma \times t(n, \alpha)$, уменьшаются при увеличении количества опытов n и при уменьшении доверительной вероятности α . Наиболее часто применяют коэффициенты $t(6, 0,9) = 2,02$ и $t(10, 0,9) = 1,83$.

Таблица 3.2. Значения коэффициентов Стьюдента $t(n, \alpha)$ для различных значений числа измерений n и различных значений доверительной вероятности α . Наиболее часто применяемые коэффициенты выделены жирным шрифтом

n	α		
	0,900	0,950	0,990
2	6,31	12,71	—
6	2,02	2,57	4,03
10	1,83	2,26	3,25
20	1,72	2,09	2,84

Результат измерения всегда представляют как среднее значение с указанием доверительного интервала $\bar{x}_{cp} \pm t(n, \alpha) \times \sigma$.

Теперь рассмотрим источники случайной погрешности. По моему мнению, большинство из них: погрешности взвешивания, приготовления растворов, дозирования, погрешности в разметке пика — можно считать тривиальными. Разумеется, это не значит, что их вклад мал — просто комментировать здесь особенно нечего. Специального внимания заслуживает погрешность в определении площади пика в результате влияния шума детектора — поскольку ее вклад становится определяющим на нижней границе определяемых концентраций.

Среднеквадратическое отклонение для этой составляющей напрямую связано с отношением сигнал/шум (SN) для данного пика. Так, процентное значение СКО можно оценить по формуле $\%СКО = 50/SN$; и наоборот, правильность определения отношения сигнал/шум можно оценить по формуле $SN = 50/\%СКО$, проведя серию из 5–6 определений для расчета СКО. Как следует из этой зависимости, в области LOD ($SN = 3$) среднеквадратическое отклонение составляет порядка 17%, а в области LLOQ ($SN = 10$) — около 5%.

Как известно, погрешность накапливается в виде дисперсий, то есть общее СКО равно геометрической сумме СКО отдельных вкладов: $\sigma_{общ} = \sqrt{(\sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_3^2 + \dots)}$. Приемлемой можно считать ситуацию, когда СКО отдельного вклада не превосходит половины общего СКО. В этом случае доля этого вклада в общее СКО не превышает 15%.

Теперь определим отношение сигнал/шум, приемлемое для достижения заданной прецизионности. Допустим, максимальная погрешность составляет $\pm 2\%$ (высокие требования к прецизионности). Если коэффициент Стьюдента принять равным двум, то предельное СКО окажется равным 1%. Половина от 1% — это 0,5%: такую погрешность для отдельного вклада можно считать для этого случая приемлемой. Воспользуемся

формулой $SN = 50/\%СКО$. Считаем: $SN = 50/0,5 = 100$, то есть при высоких требованиях к прецизионности метода отношение сигнал/шум для пика аналита должно составлять порядка 100. Легко подсчитать, что для нормальных требований к прецизионности на уровне LLOQ ($\pm 20\%$) отношение сигнал/шум для пика аналита должно составлять $SN = 10$, то есть мы просто пришли к определению LLOQ.

В отличие от случайной погрешности, которая становится видимой в результате проведения повторного испытания, систематическая погрешность может быть «невидимой» в принципе. Если не накапливается и не анализируется статистика, не проводятся межлабораторные и контрольные испытания, то о существовании систематической погрешности можно даже не догадываться.

Источники ее возникновения также условно можно разделить на две категории. Первая категория обусловлена плохим качеством применяемой методики — если ее валидация не проводилась либо проводилась с нарушениями. Вторая категория обусловлена человеческим фактором: недостаточной квалификацией оператора, его невнимательной работой, отсутствием контроля результатов и т.д. Как уже было замечено в разд. 3.3, это комплексная проблема, которая решается только при помощи комплексного подхода.

В последнее время производятся попытки ввести в метрологию альтернативный подход к оценке точности измерения, основанный на понятии «неопределенность измерения». Метод этот экспериментальный, неотработанный, имеющий много спорных моментов, очень сложный и запутанный в плане математики. Например, автор книги, проходивший обучение на химфаке МГУ в специализированной группе «вычислителей», сдался при попытке понять математику довольно быстро, после нескольких выражений с частными производными третьего порядка.

Поражает и сам подход к моделированию: «...Идейной основой замены термина «погрешность» на «неопределенность» является философская предпосылка агностицизма о том, что «истинное значение» непознаваемо и погрешность, как базирующаяся на использовании истинного значения измеряемой величины, теряет смысл». Конечно, можно рассмотреть такую модель, в которой нет истинного значения — в качестве гимнастики для ума. Но вот стоит ли применять ее на практике?

3.4.3. Одноточечная градуировка

Градуировка по одной точке применяется во всех случаях, когда концентрация целевого соединения в пробе примерно известна и необходимо уточнить результат.

К примеру, проводится исследование продуктов питания на безопасность; для расчета концентрации применяется многоточечная градуировка в широком диапазоне. Допустим, найденная концентрация аналита в нескольких образцах оказывается очень близкой к предельно допустимой (ПДК). Однако, точность метода, разработанного для широкого диапазона, недостаточна для уверенного ответа на вопрос — больше или меньше ПДК содержится в этих образцах. Тогда делают одноточечную градуировку и проводят определение в данных образцах с большей точностью.

Другой вариант: необходимо провести однократное определение содержания аналита. Многоуровневую градуировку строить нет смысла. Тогда проводят определение, оценивают уровень концентрации аналита, готовят градуировочный раствор ожидаемой концентрации и далее по нему рассчитывают количество аналита — получаются вполне приемлемые результаты.

Третий вариант применения одноточечной градуировки: производственный контроль, к примеру, определение количества действующего соединения в таблетках.

Как было показано в разд. 3.4.1, при одноточечной градуировке градуировочная зависимость между условным «сигналом» и условной «концентрацией» $S = f(C)$ приобретает наиболее простой вид прямой пропорциональности $S = k \times C$ с коэффициентом, который называется фактором отклика: абсолютным (для градуировки по внешнему стандарту) или относительным (для градуировки по внутреннему стандарту). В методе внешнего стандарта «сигналом» является площадь пика, а «концентрацией» — количество вещества в аликвоте стандартного образца, введенное в хроматограф; градуировка строится в координатах $n_{ст}$ (ось x), $S_{ст}$ (ось y). В методе внутреннего стандарта «сигналом» является площадь пика, деленная на площадь пика внутреннего стандарта, а «концентрацией» — количество вещества во всем стандартном образце, деленное на количество внутреннего стандарта во всем стандартном образце; градуировка строится в координатах $N_{ст}/N_{ст}^{IS}$ (ось x), $S_{ст}/S_{ст}^{IS}$ (ось y).

Для получения одной точки готовят от 6 до 10 градуировочных растворов (стандартных образцов) и проводят их анализ. Растворитель, применяемый для приготовления стандартных образцов, по составу должен быть как можно ближе к растворителю пробы (это может касаться также pH, содержания ион-парных и модифицирующих добавок и т.д.). Вообще, опытные аналитики предпочитают готовить стандартные образцы не в чистых растворителях, а в реальных пробах с надежно доказанным отсутствием аналита — поскольку компоненты матрицы образца могут оказать влияние на определяемые факторы отклика. Однако, для ВЭЖХ с фотометрическим детектированием, например, это не характерно.



АНАЛИТИЧЕСКОЕ И ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Компания «Аквилон» разрабатывает и производит жидкостные хроматографы «Стайер», которые более 10 лет успешно используются в аналитических лабораториях для контроля показателей безопасности и качества различных видов продукции и сырья, в том числе пищевых продуктов и лекарственных средств, а также при мониторинге объектов окружающей среды и химическом контроле технологических параметров различных производств.

ЖИДКОСТНЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ «СТАЙЕР»

- Соблюдение требований международных стандартов
- Оптимальное соотношение цены и качества
- Гарантийное и постгарантийное обслуживание
- Обучение специалистов лабораторий
- Комплектование в соответствии с аналитической задачей

ИОННЫЙ ХРОМАТОГРАФ

оптимальная система для анализа минеральных ионов

ИЗОКРАТИЧЕСКИЙ ХРОМАТОГРАФ

эффективная система для решения рутинных задач

ГРАДИЕНТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

универсальный и надежный инструмент для анализа сложных объектов

Хроматографы жидкостные «Стайер» внесены в Государственные реестры средств измерений Российской Федерации, Украины, Республики Беларусь, Казахстана.

ОСНОВНЫЕ МОДУЛИ

Детектор кондуктометрический CD 510

Объем измерительной ячейки 20 мм³
Макс. обратное рабочее давление 25 бар
Пределы измерения сопротивления ячейки 50-10⁷ Ом.



Детектор флуориметрический 121 M

Источник света — светодиод 365±5 нм или 2 светодиода 280 и 365±5 нм
Диапазон измерений переключаемый (дискретный) выбираемый 330-400, 400-600 нм
Детектируемый объем 1 мкл
Максимальный поток 15 мл/мин.



Насос серии II

Диапазон расхода 0,01-10 мл/мин.
Диапазон давлений 0-300 бар (PEEK) 400 бар (SS316).
Встроенный демпфер пульсаций.
Встроенный кран сброса/готовности линии.
Встроенный манометрический модуль RS232 стандартный интерфейс.



Детектор спектрофотометрический UVV 104.1 M

Рабочий диапазон длин волн 190-600 нм.
Полупрозрачная спектральная линия 6 нм.
Автоматическая смена длин волн с помощью таймерной программы, встроенной в детектор.
Стабильная работа в коротковолновой части спектра 200-220 нм.
Легкая замена лампы без дополнительной юстировки.



Детектор рефрактометрический дифференциальный 102 M

Источник света — светодиод 650 нм.
Диапазон измерений 1.0-1.81 RIU.
Шум базовой линии 10⁻⁸ RIU.
Дрейф базовой линии 3x10⁻⁸ RIU.
Объем оптической ячейки 2 мкл.
Максимальный поток 15 мл/мин.



Дегазатор DG 18

Предназначен для удаления растворенных газов из элюента.
Два независимых дегазационных канала.
Оптимальный расход элюента через камеру 3 мл/мин.
Материал жидкостного тракта PEEK, PTFE.



АНАЛИТИЧЕСКОЕ И ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ



phenomenex

Компания «Аквилон» — официальный дистрибьютор компании «Phenomenex»

Компания «АКВИЛОН» с 1998 года представляет в Российской Федерации продукцию компании PHENOMENEX — одного из ведущих производителей колонок и расходных материалов для хроматографии. Компания PHENOMENEX производит колонки с сорбентами на основе высокочистых силикагелей разной пористости и полимерных носителей, а также постоянно разрабатывает новые сорбенты с уникальными свойствами.



Колонки серии **LUNA** с широким выбором фаз являются одними из самых распространенных ВЭЖХ-колонок в мире. Высокая стабильность в диапазоне pH от 1,5 до 10 при работе не менее 1000 ч. Широкий выбор фаз: Si, C5, C8, C18, Phenyl-Hexyl, CN, NH2, SCX. Сферическая силикагельная матрица.

synergi



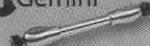
Synergi Hydro-RP. Полярный эндкеппирующий реагент обуславливает стабильность колонки в 100 % водной среде.

Synergi Max-RP. В качестве привитой фазы используются группы C12.

Synergi Polar-RP. Уникальная фаза на основе фенильных групп, пришитых к силикагелю через эфирный мостик.

Synergi Fusion-RP. Обращенно-фазовый сорбент, улучшенный добавкой полярных лигандов.

Gemini



GEMENY — современные колонки для ВЭЖХ-технологий, совмещающие эффективность силикагеля с химической инертностью органического полимера (технология TWIN — два в одном).

REZEX



Колонки серии **REZEX** содержат сферические частицы сульфированного сополимера стирола с дивинилбензолом со степенями сшивки 4% и 8% в различных ионных формах: кальциевой, натриевой, водородной, калиевой, свинцовой и серебряной.

BioSep



BioSep-SEC-S — высокоэффективные колонки для гель-фильтрационной хроматографии, разработанные для разделения белков и пептидов.

KINETEX



KINETEX — специализированный сорбент для высокоскоростной УНПЛС с высокой эффективностью разделения и возможностью уменьшения времен удерживания до 20 раз. Выбор фаз.

ONYX



ONYX — монолитные колонки на основе силикагеля. Специальная революционная технология организации бимодальной структуры пор. Низкое давление на колонку.

Jupiter



JUPITER — широкопористые силикагели с зернением 300E для анализа белков. pH — 1,5 - 10.

Jupiter Proteo используются для определения аминокислотного состава белков. Колонки обладают улучшенной воспроизводимостью анализа для выделения и очистки аминокислотного состава белков, для воспроизводимого разделения сложных образцов трипсинных гидролизатов и олигонуклеотидов с числом мономеров в цепи менее 30.

Далее, проводят расчет СКО и доверительного интервала (см. разд. 3.4.2). Надо понимать, что рассчитанный доверительный интервал является суммарной оценкой лишь тех видов погрешности, которые носят для данной градуировки случайный характер. К примеру, если все стандартные образцы приготовим из одной навески стандартного вещества, то мы учтем погрешности приготовления растворов, дозирования и т.д., но погрешность взвешивания станет систематической; мы ее не увидим и никак не сможем учесть. Чем больше допустим систематических погрешностей — тем менее правильным будет определение.

На градуировочный график наносят полученную точку и доверительный интервал в этой точке (см. рис. 3.13a). Проведем через нее прямую, уходящую в начало координат — это *градуировочная кривая* (хотя в этом случае она, вообще говоря, прямая). Через верхнюю и нижнюю границы доверительного интервала проведем две прямые, параллельные градуировочной — они обозначают доверительный интервал в окрестности ожидаемой концентрации (мы предполагаем, что в ней он одинаков).

Проводим анализ реальной пробы; рассчитываем площадь пика аналита $S_{ан}$ (если используем метод внешнего стандарта), или отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта $S_{ан}/S^{IS}$ (если используем метод внутреннего стандарта). Откладываем значение на оси y и проводим через него прямую, параллельную оси x. Она пересекает градуировочную кривую и границы доверительного интервала в трех точках. Средняя точка (пересечение с калибровочной прямой) соответствует искомой «концентрации» ($n_{ан}$ или $N_{ан}/N^{IS}$, соответственно), а крайние точки соответствуют границам доверительного интервала, но на этот раз уже для найденного значения «концентрации» ($n_{ан} \pm \delta_1$ или $N_{ан}/N^{IS} \pm \delta_1$) (см. рис. 3.13a).

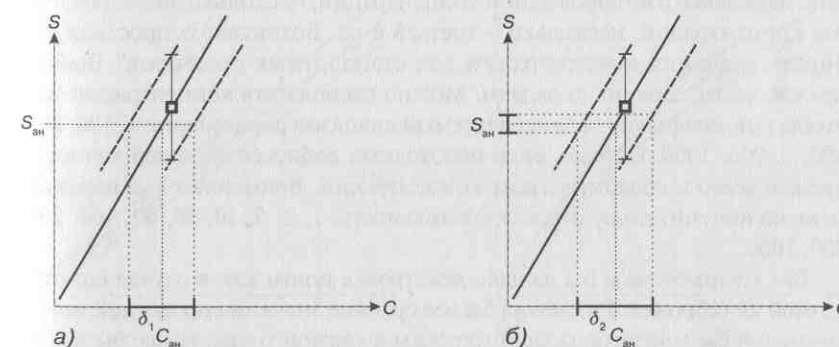


Рис. 3.13. Одноточечная градуировка

Здесь мы учитываем только погрешность градуировки и не учитываем погрешность самого определения аналита в пробе. Строго же говоря, для получения наиболее правильного результата нам следовало бы провести определение по примерно такой же схеме, как и калибровку: приготовить десять проб, их проанализировать, результаты измерений усреднить, рассчитать доверительный интервал и т.д. Но далеко не всегда это оказывается оправданным с точки зрения затрачиваемого на анализ времени.

Как правило, погрешность определения оценивается в процессе разработки методики анализа, то есть она уже приведена в методических указаниях. Таким образом, аналитику достаточно отметить границы погрешности, взятой из методики, на вертикальной оси (см. рис. 3.13б) градуировочного графика и при помощи построения, показанного на рисунке, найти новый доверительный интервал для найденной концентрации. Конечно, он будет шире, чем в первом случае, поскольку теперь мы учитываем и погрешность градуировки, и погрешность самого определения.

Одноточечная градуировка не предназначена для точных количественных измерений в областях, удаленных от ожидаемого значения концентрации ориентировочно более чем на $\pm 30\%$.

3.4.4. Многоточечная градуировка.

Применение линейной и нелинейной регрессии; критерии приемлемости аппроксимации

Градуировка по нескольким точкам применяется при необходимости проводить измерения в некотором диапазоне концентраций (range). Сразу отмечу, что в этом случае большое значение приобретают функциональность и удобство программного обеспечения прибора.

Итак, сначала мы готовим стандартные растворы разных концентраций: несколько растворов одной концентрации, несколько растворов другой концентрации, несколько – третьей и т.д. Возникает вопрос: как выбирать значения концентраций для стандартных растворов? Выбор, прежде всего, зависит от задачи. Можно располагать концентрации так, чтобы они «закрыли» весь исследуемый диапазон равномерно: 1, 100, 200, 300, ... 900, 1000. Однако, если необходимо добиться хорошей точности прежде всего в области низких концентраций, применяют так называемую экспоненциальную последовательность: 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000.

Без компьютера я бы дальше действовал почти как в случае одноточечной калибровки. Рассчитал бы все средние значения по каждой точке, вычислил бы доверительные интервалы в каждой точке, нанес бы все на градуировочный график, на миллиметровую бумагу. Соединил бы все пять

средних значений линейными отрезками и получил бы *кусочно-линейную градуировочную кривую*. Далее соединил бы таким же образом и границы доверительных интервалов (см. рис. 3.14).

Но такой метод уже больше не применяют. Компьютер позволяет сделать все немного иначе и при этом значительно проще. А именно – сразу по имеющимся точкам вычислить три аналитические функции для всего диапазона: одна будет градуировочной кривой и две других – границами доверительного интервала, теперь уже для всего диапазона концентраций.

Этот подход называется *регрессией* (regression). Если функция – это линия, то регрессия называется линейной (linear regression), если парабола – квадратической (square regression) и т.д. Бывают и более сложные регрессии (кубическая, четвертого порядка), но в хроматографии, как правило, применяют только линейную и квадратическую (см. рис. 3.15).

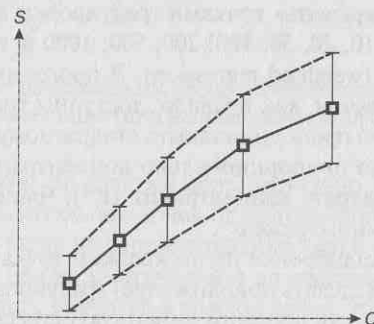


Рис. 3.14. Кусочно-линейная градуировка

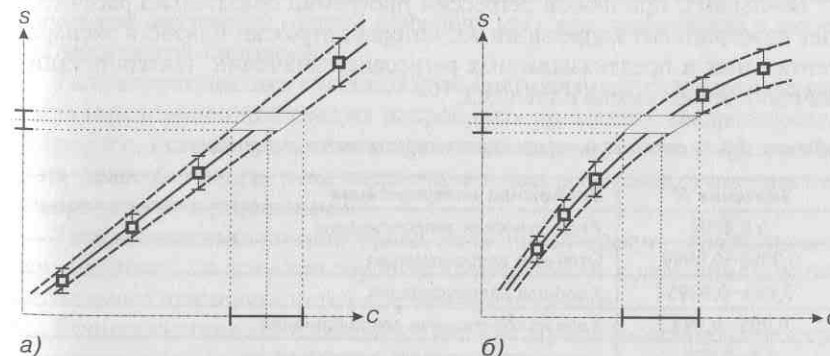


Рис. 3.15. Многоточечная градуировка с аппроксимацией методом МНК

При регрессии калибровочная кривая в общем случае не проходит через средние значения в каждой точке. Регрессия осуществляется *методом наименьших квадратов*, МНК (least square method). На самом деле, существует бесконечное число вариантов того, как провести линию через множество точек. Чтобы окончательно определить ход градуировочной кривой, необходимо задать коэффициент, называемый *весом* (weight) точки.

Если вес всех точек равен единице, то такой метод называется *невзвешенной регрессией* (unweighted regression). Он хорош в том случае, когда мы заинтересованы в получении минимальной погрешности в центре диапазона и в области высоких концентраций. Тогда нам следует равномерно «закрыть» диапазон точками градуировки: 1, 100, 200, 300, ... 900, 1000 — и применить метод невзвешенной регрессии.

Иначе следует поступать, когда мы заинтересованы в получении минимальной погрешности в области низких концентраций. В этом случае диапазон следует «закрывать» точками градуировки по экспоненциальному закону: 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 — и применять *метод взвешенной регрессии* (weighted regression). В программном обеспечении импортного оборудования, как правило, доступны три вида весовых коэффициентов: обратно пропорционально квадратному корню из концентрации ($c^{-1/2}$), обратно пропорционально концентрации (c^{-1}) и обратно пропорционально квадрату концентрации (c^{-2}). Чаще всего применяют коэффициент c^{-1} , немного реже c^{-2} .

При проведении калибровки по нескольким точкам сначала пытаются *аппроксимировать* (сделать приближение) градуировочную кривую линейной функцией, то есть провести линейную регрессию. Далее смотрят, насколько эта аппроксимация приемлема. Для этого существуют два простых критерия.

Во-первых, при любой регрессии программа обязательно рассчитывает коэффициент корреляции R^2 , который отражает близость экспериментальных и предсказываемых регрессией значений. Интерпретация значений R^2 приведена в табл. 3.3.

Таблица 3.3. Возможная интерпретация коэффициентов корреляции

Значение R^2	Возможная интерпретация
$\geq 0,9999$	Аналитическая аппроксимация
0,9995–0,9999	Отличная аппроксимация
0,999–0,9995	Хорошая аппроксимация
0,995–0,999	Удовлетворительная аппроксимация
0,8–0,995	Неудовлетворительная аппроксимация
$< 0,8$	Отсутствие зависимости

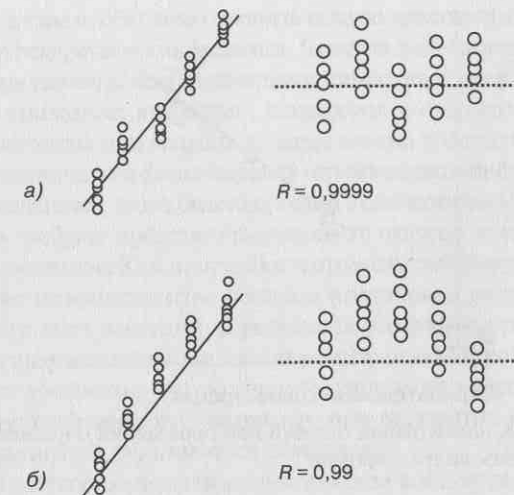


Рис. 3.16. Тест на нормальное распределение отклонений: приемлемая аппроксимация (а) и неприемлемая аппроксимация (б)

Во-вторых, можно, по крайней мере, визуально, проанализировать отклонения экспериментальных точек от полученной калибровочной кривой (см. рис. 3.16). Если экспериментальные точки располагаются вокруг расчетной кривой не систематически и доверительный интервал захватывает большую часть значений в каждой точке, то аппроксимация приемлема (см. рис. 3.16а). Если в расположении точек вокруг кривой просматривается четкая закономерность, то аппроксимация неприемлема (см. рис. 3.16б). Вообще, эта операция называется *тестом на нормальное распределение отклонений* (normal probability test), она реализована в любой статистической программе.

Если аппроксимация линейной функцией оказывается неприемлемой, тогда вместо линейной следует попробовать применить квадратическую регрессию. Если неприемлема квадратическая, то кубическую регрессию и так далее до тех пор, пока корреляция и распределение отклонений не станут удовлетворительными.

Теперь несколько комментариев. Если нас интересует область низких концентраций, то даже при хорошем коэффициенте корреляции $\geq 0,9999$ необходимо применять метод взвешенной регрессии.

Если ордината пересечения градуировочного графика с осью y (y -intercept) оказывается меньше ширины доверительного диапазона, аппроксимированного к нулевой концентрации (SE_y , standard error/ $y = 0$), то к градуировке

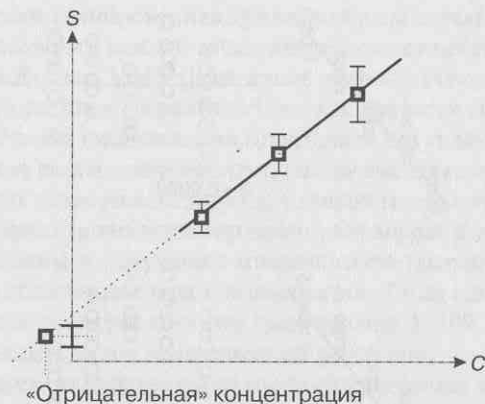


Рис. 3.17. К иллюстрации ошибки при проведении определения вне диапазона градуировки

можно добавить еще одну точку — начало координат. После этого параметры градуировки необходимо пересчитать.

Не могу не предостеречь от совершения очень простой, но, как показывает мой опыт, очень распространенной ошибки. При проведении количественных определений необходимо помнить о том, что точный результат можно получить лишь для концентраций внутри диапазона, охватываемого градуировкой. Попытка рассчитать концентрацию в точке вне этого диапазона может вообще закончиться курьезно, например, получением отрицательной концентрации (см. рис. 3.17).

3.4.5. Полуколичественные измерения

Отдельного внимания заслуживают случаи, когда концентрацию аналитов оценивают, не имея их стандартных образцов. Эти случаи можно условно разделить на три категории.

В первую категорию выделим случаи, когда количественный анализ осуществляют методом внутреннего стандарта, при этом факторы отклика не определяют экспериментально, а берут их из литературных источников (включая методические указания).

Во вторую категорию выделим случаи, когда на первом этапе все аналиты переводят в меньшее число соединений, для которых существуют стандарты, и определяют их количественно; на втором этапе пересчитывают концентрацию производных в концентрацию аналитов, используя эмпирические зависимости, взятые из литературных источников (включая методические указания).

К примеру, нам необходимо оценить общую массовую долю гликозидов флавонолов в лекарственном растении. Сначала подвергаем образец гидролизу, затем при помощи метода внешнего стандарта количественно определяем тройку агликонов: кверцетин, кемпферол и изорамнетин, в которые переходят гликозиды при гидролизе. Здесь можно и остановиться, используя для результата анализа формулировку «сумма агликонов флавонолов равна [значение] значению», и это будет хороший количественный анализ.

Но часто требуют представить результат именно как концентрацию исходных гликозидов. Как поступают в этом случае? Берут из литературы эмпирические коэффициенты, которые получены в результате исследований данного вида растений, в результате умножения на которые концентрация агликонов переводится в концентрацию гликозидов. При этом надо хорошо понимать, что полученное значение является достаточно грубой оценкой. Более того, например, при раскрытии фальсификаций этим методом нельзя пользоваться заведомо.

В третью категорию выделим случаи, когда концентрацию структурно подобных аналитов оценивают, применяя лишь один стандартный образец одного из аналитов. Допущение состоит в том, что факторы отклика для всех аналитов принимают приблизительно одинаковыми. Разумеется, это также довольно грубое приближение.

При применении этого метода надо помнить, что при калибровке следует применять не массовую, а *мольную концентрацию* (количество вещества в единице объема). Тогда массовую концентрацию каждого аналита можно будет рассчитать после проведения определения, умножив полученную мольную концентрацию аналита на его молекулярную массу.

3.4.6. Контроль коэффициентов извлечения при помощи метода внутреннего стандарта. Применение стандартов-суррогатов (surrogate standard) и стандартов выхода (recovery standard)

В сложной методике, включающей одну или несколько стадий подготовки пробы, значительная доля погрешности может быть внесена на стадиях экстракции, концентрирования и особенно очистки. Применение метода внутреннего стандарта дает возможность в каждом проводимом определении учитывать потери аналитов в процессе экстракции и подготовки пробы, а также контролировать степени извлечения аналитов на любой отдельно взятой стадии аналитической процедуры. Специальные внутренние стандарты, которые добавляются в образец до экстракции, называются *стандартами-суррогатами* (surrogate standards). Эти стандар-

ты подбираются таким образом, чтобы их поведение в процессе экстракции, концентрирования и очистки как можно более полно соответствовало поведению аналитов. Поэтому стандарты-суррогаты часто называют *стандартами-имитаторами*. Если одновременно определяют несколько аналитов, которые значительно различаются по своим физико-химическим свойствам, то их делят на группы со сходными свойствами и для каждой группы подбирают индивидуальный стандарт-суррогат.

Для контроля степени извлечения стандартов-суррогатов также применяют метод внутреннего стандарта: в пробу перед вводом в хроматограф вносят известное количество *стандарта выхода* (recovery standard). Если степени извлечения стандартов-суррогатов, а, следовательно, и самих аналитов, оказываются приемлемыми (например, более 50%), пробоподготовку считают проведенной успешно. Это дает уже право проводить количественный анализ; расчет количеств аналитов проводят непосредственно по стандартам-суррогатам. Таким образом, стандарты-суррогаты применяют для *учета потерь*, а стандарт выхода — для *контроля потерь* аналитов в процессе подготовки пробы (см. рис. 3.18).

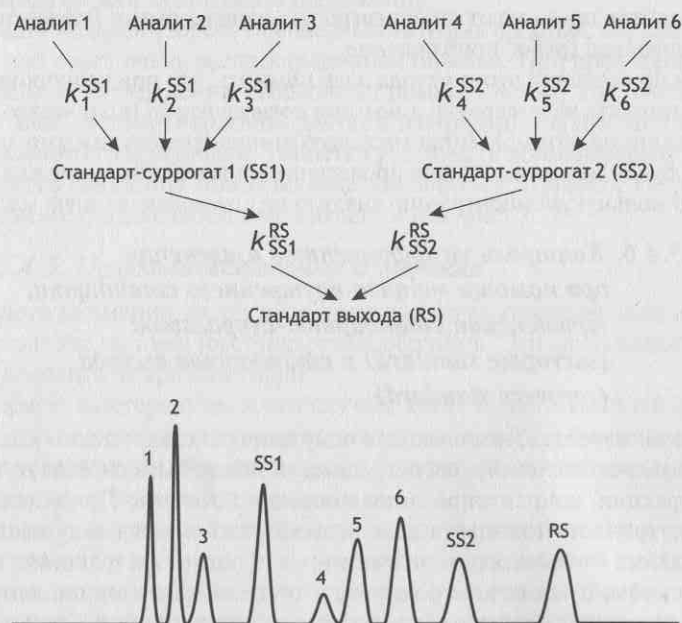


Рис. 3.18. Схема расчета факторов отклика в методе внутреннего стандарта со стандартами-суррогатами и стандартом выхода

Иногда эту схему усложняют, вводя в экстракт третий тип внутреннего стандарта — *стандарт очистки* (clean-up standard) — перед стадией его очистки. Смысл заключается в том, чтобы получить отдельные оценки потерь аналитов — на стадии очистки и на стадии экстракции. Такие исследования проводят, к примеру, при разработке методик.

3.4.7. Валидация хроматографических методик

Валидация аналитической методики является процедурой, проводимой для подтверждения ее применимости для проведения данного анализа (The objective of validation of an analytical procedure is to demonstrate that it is suitable for its intended purpose). Подразумевается, что валидация методики предшествует ее формальному утверждению, то есть аттестации. Не останавливаясь на формальных моментах, постараемся в общих чертах понять, как проводятся такие исследования.

Каждая аналитическая методика содержит ряд декларируемых показателей, которые называют *валидационными характеристиками* (validation characteristics). Их типичный набор: правильность, повторяемость, специфичность, предел(ы) детектирования, предел(ы) определения, диапазон. Для хроматографических методик важной характеристикой является также устойчивость (robustness).

Специфичность (specificity) надо понимать как возможность провести по данной аналитической методике определение аналитов при возможном наличии в пробе типичных мешающих определению (маскирующих) соединений: основных компонентов матрицы образца, примесей, продуктов деградации и т.д. (Specificity is the ability to assess unequivocally the analyte in the presence of components which may be expected to be present. Typically these might include impurities, degradants, matrix, etc.)

Для того, чтобы доказать высокую специфичность методики, можно:

- 1) набирать обширную статистику на реальных пробах;
- 2) проводить специальные эксперименты на модельных образцах, содержащих повышенные концентрации компонентов матрицы и типичных примесей;
- 3) проводить специальные эксперименты по влиянию различных видов воздействий на образец, если показано, что компоненты образца могут претерпевать химические превращения с образованием мешающих определению продуктов деградации.

При недостаточной специфичности аналитической методики в ее тексте желательно указывать ряд дополнительных аналитических процедур, которые можно привлекать для разрешения тех или иных проблем (Lack of specificity of an individual analytical procedure may be compensated by other supporting analytical procedure(s)).

Другими словами, перекрытие пика аналита с пиком примеси должно быть событием исключительным. Но уж если оно произошло (более того — если признается, что это происходит нередко), то эта проблема ни в коем случае не должна ставить аналитика в тупик. Методика должна содержать недвусмысленные (unequivocal) указания о том, как поступить в том или ином случае. В принципе, все основные приемы, применяемые для разрешения подобных проблем, были обсуждены в разд. 3.3.

Устойчивость (robustness) надо понимать как «запас прочности» методики при воздействии на аналитическую процедуру (включая экстракцию, пробоподготовку и инструментальный метод анализа) небольших возмущений, которые, тем не менее, могут привести к существенному изменению ее характеристик. (The robustness of an analytical procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small, but deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability during normal usage).

В случае жидкостной хроматографии такими возмущениями могут быть:

- погрешность приготовления элюента;
- погрешность pH элюента;
- неподвижная фаза иного производителя;
- иная температура колонки;
- иная скорость подвижной фазы;
- иной растворитель для приготовления пробы и т.д.

В случае подготовки пробы такими возмущениями могут быть:

- несоблюдение времени экстракции или гидролиза;
- несоблюдение техники экстракции (к примеру, иная скорость перемешивания);
- несоблюдение техники твердофазной экстракции (например, недостаточная осушка картриджа, его недостаточная или чрезмерная промывка) и т.д.

Одним из наиболее часто применяемых способов представления правильности количественного определения при валидации является форма «введено-найденно». Количества введенного в образец стандарта аналита и найденного аналита приводятся рядом с указанием соответствующих доверительных интервалов. Правильность желательно оценивать не менее чем для трех точек диапазона: в середине, в области низких и в области высоких концентраций.

Повторяемость желательно оценивать, по крайней мере, для четырех точек диапазона: при максимальной концентрации, в середине диапазона, на уровне предела определения и между серединой диапазона и пределом определения.

ГЛАВА 4

ОПТИМИЗАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

4.1. Основы теории процесса разделения в ВЭЖХ

4.1.1. Теория скоростей и уравнение Ван-Деемтера.

Кинетика массопередачи в хроматографической системе. Зависимость Энделя и Халаша

Развитие теоретических представлений в хроматографии происходило постепенно. Исторически сложилось так, что теория газовой хроматографии начала развиваться раньше, чем теория жидкостной хроматографии.

Первой была разработана теория тарелок. В ней, как уже указывалось, было дано понятие о высоте, эквивалентной теоретической колонке, ВЭТТ. Теория тарелок дает очень важную формулу, которая описывает зависимость разрешения двух пиков от трех факторов: селективности, фактора удерживания и эффективности (или обратной ей величины ВЭТТ). Именно поэтому теория тарелок была рассмотрена в первую очередь (см. гл. 1): без нее нельзя было рассказать, каким образом можно увеличить разделение двух пиков.

В плане же оптимизации разделения тарелочная теория не дает ровным счетом ничего. В ней вводится само понятие ВЭТТ, но не объясняется, какое влияние на ВЭТТ оказывают различные факторы: размер частиц адсорбента, скорость потока, диффузионные процессы внутри колонки и т.д. Все эти вопросы рассматриваются в теории скоростей, которая исторически появилась после теории тарелок.

Основной зависимостью в теории скоростей является уравнение Ван-Деемтера, которое устанавливает связь между ВЭТТ и скоростью подвижной фазы:

$$H = A + B/u + C \times u,$$

где H — высота, эквивалентная теоретической тарелке, ВЭТТ; u — линейная скорость элюента; A , B , C — коэффициенты.

Это уравнение хорошо применимо и в жидкостной хроматографии для современных высокоэффективных колонок, заполненных адсорбентами на основе силикагеля с размером частиц 3–5 мкм.

Надо отметить, что u — это не объемная скорость потока, а линейная, выраженная, к примеру, в сантиметрах в секунду. Линейная скорость может быть пересчитана из объемной скорости, если известна общая пористость упаковки ϵ_m , то есть доля объема колонки, доступной для элюента. Обычно ϵ_m варьируется от 0,7 до 0,8, ее точное значение надо определять для данной колонки экспериментально.

Если линейную скорость требуется вычислить однократно, то удобнее просто разделить длину колонки на экспериментально определенное значение нулевого времени:

$$u = L/t_0,$$

где t_0 выражается в секундах, L в сантиметрах и u имеет размерность см/сек.

Если проводится работа по определению зависимости Ван-Деемтера, то для каждой колонки сначала надо рассчитать ϵ_m , зная экспериментальное значение t_0 :

$$\epsilon_m = (4 \times v \times t_0) / (\pi \times 60 \times L \times d_c^2),$$

где v — объемная скорость потока, выраженная в мл/мин, t_0 — экспериментальное нулевое время, выраженное в секундах, L — длина колонки, см, d_c — диаметр колонки, см.

Тогда линейную скорость для данной колонки можно будет напрямую вычислять из объемной скорости потока:

$$u = 4 \times v / (\pi \times 60 \times \epsilon_m \times d_c^2),$$

где u выражается в см/сек и v выражается в мл/мин. К примеру, пусть $\epsilon_m = 0,75$, тогда при объемной скорости 1 мл/мин линейная скорость будет составлять 0,267 см/сек.

Часто возникает необходимость быстро оценить, во сколько раз нужно изменить объемную скорость потока при переходе на колонку другого диаметра. В этом случае можно принять ϵ_m для обеих колонок равной. Фактор отклика будет равен квадрату отношения диаметров колонок: $(d_c^1/d_c^2)^2$. Например, при переходе с колонки $250 \times 4,6$ на колонку 250×2 для сохранения тех же условий анализа объемную скорость потока надо уменьшить в $(0,46/0,2)^2 = 5,29$ раза, к примеру, с 1 до 0,190 мл/мин.

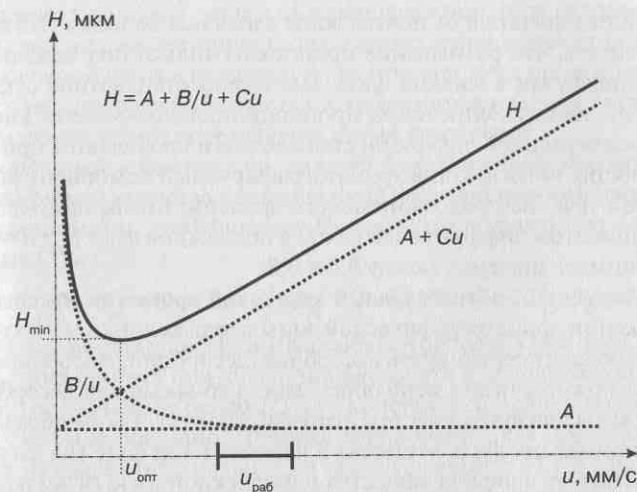


Рис. 4.1. График зависимости Ван-Деемтера

График зависимости Ван-Деемтера приведен на рис. 4.1. Видно, что он проходит через минимум. Этот минимум соответствует скорости потока, при которой ВЭТТ минимальна, а удельная эффективность разделения максимальна. Таким образом, если бы основным критерием оптимизации была эффективность, то работать следовало бы именно при оптимальной скорости потока.

Тем не менее, на практике чаще всего работают при скорости потока, в несколько раз превышающей оптимальное значение. Это связано с тем, что сокращение времени анализа приносит больше выгоды, чем сохранение оптимальной эффективности — тем более, что ее потери не столь уж критичны. Обычная, рабочая скорость потока составляет порядка 0,2–0,3 см/сек, что соответствует объемной скорости порядка 0,8–1,5 мл/мин для колонок с диаметром 4,6 мм, или 0,15–0,3 мл/мин для колонок с диаметром 2 мм.

Коэффициенты A , B , C в уравнении Ван-Деемтера отражают физические процессы, протекающие в колонке. Рассмотрим их.

Коэффициент A напрямую связан с качеством заполнения колонки сорбентом (λ) и с размером частиц адсорбента d_p : $A = 2\lambda \times d_p$, где λ принимает значения между 1 и 2. Чем лучше заполнена колонка сорбентом, тем меньше значение λ .

Коэффициент (осевой) молекулярной диффузии B . В процессе движения зоны компонента вдоль колонки молекулы компонента в результате

диффузии отклоняются от центра зоны вдоль оси колонки. На практике можно считать, что размывание происходит только под влиянием продольной диффузии в жидкой фазе. Поскольку стандартное отклонение молекул по закону Эйнштейна пропорционально времени диффузии, эффект молекулярной диффузии сильнее всего проявляется при небольших скоростях потока, когда хроматографируемый компонент находится в колонке в течение продолжительного времени. Коэффициент B связан с коэффициентом диффузии адсорбата в подвижной фазе D_M : $B = 2\gamma \times D_M$, где γ принимает значения между 0,6 и 0,8.

Коэффициент C , обусловленный кинетикой процессов массопередачи. При движении хроматографической зоны вдоль колонки молекулы компонента проходят серию актов адсорбции-десорбции. Адсорбированные молекулы можно считать неподвижными, в то время как десорбированные молекулы движутся вместе с потоком элюента. Таким образом, концентрационный профиль вещества в неподвижной фазе (на адсорбенте) всегда отстает от профиля вещества в подвижной фазе (в жидкой фазе). Это явление приводит к уширению хроматографической зоны, причем в прямой зависимости от скорости потока.

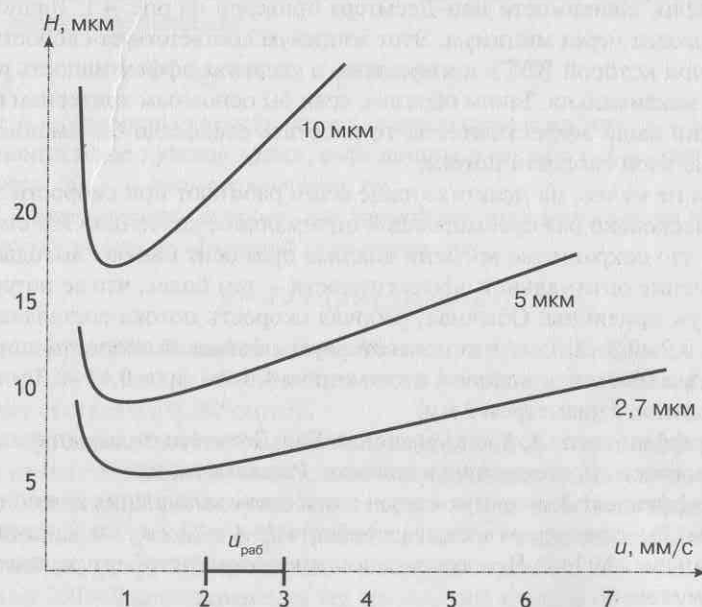


Рис. 4.2. Зависимости Ван-Деемтера для типичных силикагелевых фаз со средним диаметром частиц 2,7, 5 и 10 мкм

Отставание профиля вещества в неподвижной фазе оказывается тем сильнее, чем медленнее происходит перемещение молекул компонента из неподвижной фазы в подвижную, то есть чем хуже происходит массоперенос (массопередача) вещества в хроматографической системе. Кинетика массопередачи определяется двумя факторами:

- 1) диффузией вещества в подвижной фазе (внешний массообмен);
- 2) диффузией вещества в неподвижной фазе (внутренний массообмен).

Соответственно, коэффициент C можно представить как сумму двух слагаемых C_M и C_S :

$$C = C_M + C_S = \omega \times d_p^2 / D_M + q \times k' / (k' + 1)^2 \times (d_p^2 / D_S),$$

где D_S — коэффициент диффузии адсорбата в неподвижной фазе, d_p — средняя величина пробега при диффузии адсорбата в неподвижной фазе, q — константа со значением около 2/3; ω — константа со значением от 0,02 до 0,5.

Как уже было показано, хроматографирование, как правило, ведут на скорости, большей оптимальной. В таких условиях ВЭТТ в основном определяется кинетическим фактором $C \times u$. Соответственно, задача по уменьшению ВЭТТ сводится, по сути, к поиску путей уменьшения влияния кинетического фактора, то есть улучшения массопередачи в хроматографической системе.

Наиболее действенной мерой уменьшения ВЭТТ является выбор адсорбента с меньшим диаметром частиц, поскольку диффузия вещества в неподвижную фазу из подвижной и обратно для мелких частиц осуществляется значительно легче, чем для крупных.

В жидкостной хроматографии для силикагелевых адсорбентов зависимость коэффициента C от диаметра частиц адсорбента хорошо описывается зависимостью Энделя и Халаша: $C = d_p^{1.5} / (2 \times D_M)$. Соответственно, для области высоких линейных скоростей можно записать: $H = A + C \times u = A + d_p^{1.5} / (2 \times D_M) \times u$.

Таким образом, если мы пренебрежем слагаемым A (это можно сделать для не очень эффективных фаз и достаточно высоких скоростей), то сможем напрямую оценивать влияние значения диаметра частиц на эффективность. При уменьшении d_p в 2 раза удельная эффективность увеличится примерно в $2^{1.5} \approx 2,83$ раза, а разрешение, соответственно, в $\sqrt{2,83} \approx 1,7$ раза.

Другим способом ускорения массопередачи является повышение температуры. Оно приводит к увеличению диффузии вещества как в подвижной, так и в неподвижной фазах, способствуя ускорению массообмена в системе.

4.1.2. Уравнение Дарси

Казалось бы, в погоне за оптимальными условиями разделения можно хоть до бесконечности уменьшать размер частиц адсорбента, а скорость также

до бесконечности увеличивать. Тогда удельная эффективность стремилась бы к бесконечности, а время анализа — к нулю (от чего бы все только радовались). Но «деревья не растут до небес». Оба действия — увеличение скорости потока и уменьшение диаметра частиц адсорбента — приводят к увеличению давления в колонке. Вязкую жидкость становится все труднее продавить через трубку, плотно упакованную мелким порошком. Так происходит до тех пор, пока давление не достигнет максимума, который может обеспечить насос.

Зависимость, которая спускает увлеченного оптимизацией хроматографиста с небес на землю, называется уравнением Дарси:

$$\Delta P = (u \times \eta \times L) / (K^\circ \times d_p^2),$$

где ΔP — перепад давления в колонке, u — скорость потока, η — вязкость элюента, L — длина колонки, K° — коэффициент, называемый проницаемостью колонки, d_p — средний диаметр частиц адсорбента.

Смысл этого «вредного» уравнения состоит в том, что применение самых действенных инструментов оптимизации разделения ограничено чисто техническими причинами. При заданном давлении и времени анализа нельзя на практике достичь эффективности, большей некоторой предельной величины. И наоборот, при заданном давлении и эффективности нельзя на практике добиться времени анализа меньшей некоторой предельной величины.

Вывод: чем-то надо жертвовать. Другое дело, что жертвовать можно неумело и много, а можно и со знанием дела, по минимуму. В этом и состоит искусство оптимизации.

4.2. Регулирование основных параметров хроматографического анализа

4.2.1. Способы увеличения эффективности разделения

Вначале разберем способы увеличения эффективности разделения.

Уменьшение среднего диаметра частиц адсорбента d_p . Безусловно, наиболее действенным способом увеличения эффективности колонки является выбор колонки, упакованной адсорбентом с меньшим диаметром частиц. Как мы уже разобрали (см. разд. 5.1.1), при уменьшении d_p в 2 раза удельная эффективность увеличится примерно в $d_p^{1.5} = 2^{1.5} \approx 2,83$ раза, а разрешение, соответственно, в $\sqrt{2,83} \approx 1,7$ раза.

Плохо здесь то, что давление при этом возрастет в четыре раза — перепад давления обратно пропорционален квадрату диаметра частиц $\Delta P \sim 1/d_p^2$. К примеру, при переходе от 15 см колонки с 6 мкм адсорбентом на колон-

ку с такой же длиной, но с 3 мкм адсорбентом (d_p уменьшается вдвое) эффективность увеличивается примерно с 7000 до 20 000 т.т. (то есть эффективность возрастает примерно втрое, а разрешение в 1,7 раза); при этом давление может увеличиться от 50 атм до 200 атм.

Увеличение длины колонки L . Эффективность можно пропорционально увеличить за счет увеличения длины колонки $N \sim L$. Допустим, колонка длиной 15 см имеет эффективность 15 000 т.т. Удельная эффективность упаковки составляет 15 000 т.т./0,15 м = 100 000 т.т./м. Соответственно, колонка длиной 25 см будет иметь эффективность порядка 100 000 т.т./м $\times 0,25$ м = 25 000 т.т.

Пропорционально длине будет увеличиваться и давление $\Delta P \sim L$. Казалось бы, эта ситуация лучше, чем в первом случае, где давление при уменьшении d_p возрастало квадратично. Однако, увеличение длины колонки влечет за собой пропорциональное увеличение времени анализа, поскольку $t \sim L/u$. Чтобы компенсировать потерю времени, можно увеличить скорость потока u . Но увеличение скорости потока приведет к дальнейшему росту давления.

Таким образом, если зафиксировать время анализа, то давление все равно возрастет квадратично, поскольку $\Delta P \sim L \times u$. Да и эффективность уже увеличится не точно пропорционально длине, а немного меньше из-за ухудшения массопередачи.

Увеличение температуры T . Коэффициент S в уравнении Ван-Деемтера, отвечающий за скорость массопередачи, можно значительно уменьшить путем увеличения температуры T , что приведет к увеличению эффективности.

Увеличение температуры оказывает заметное влияние на эффективность лишь в тех случаях, когда массопередача уже изначально была довольно медленной: при применении полимерных, углеродных адсорбентов или адсорбентов с крупными частицами $d_p > 5$ мкм.

В случае применения силикагельных адсорбентов с диаметром частиц 5 мкм и менее увеличение температуры является, скорее, способом сокращения времени анализа (см. разд. 5.2.2).

Уменьшение скорости потока u до величины, соответствующей минимуму ВЭТТ на зависимости Ван-Деемтера. Опять же, этот вариант можно рассматривать только в том случае, если массопередача изначально была очень медленной.

На практике, как правило, стараются поступать наоборот — увеличивать скорость, жертвуя долей эффективности ради уменьшения времени анализа.

«Химические» методы борьбы с потерей эффективности, вызванной замедленной кинетикой адсорбции-десорбции. Нередко эффективность, рас-

считанная по пику компонента, оказывается значительно (до нескольких раз) ниже эффективности, полученной по пику модельного (нейтрально-го) соединения. Значительное уширение хроматографического пика может быть связано с замедленной кинетикой адсорбции-десорбции.

При применении силикагельных фаз этот вариант может реализоваться для полярных аналитов с протон-донорными и протон-акцепторными функциональными группами.

В этом случае необходимо скорректировать состав элюента или поменять марку хроматографической колонки. Конкретные рекомендации можно найти в гл. 5.

Борьба с потерями эффективности, которые вызваны внеколоночными элементами конструкции и неоптимальным способом инжектирования пробы. Внеколоночные элементы конструкции: система инжекции пробы, соединение между системой инжекции и колонкой, предколонка и инлайн-фильтр (если они установлены), кювета детектора и соединение между кюветой и колонкой — вносят свои вклады в размывание хроматографического пика. В этот же список можно добавить причины потери эффективности, связанные со способом инжектирования пробы.

Для всех этих факторов снижения эффективности есть общая причина, по которой они оказались в одной группе. Их негативное влияние возрастает при переходе на колонки с небольшим внутренним диаметром $d_c < 4$ мм, что особенно заметно в начале хроматограммы для сорбатов с $k' < 1-2$.

При оценке потери разрешающей способности из-за экстраколоночных объемов или объема пробы (но не объема подводящих капилляров) можно считать, что увеличение дисперсии (размывания) хроматографической зоны пропорционально экстраколоночному объему и обратно пропорционально удерживаемому объему:

$$\theta_\sigma = (V^{\text{extra}} \times \sqrt{N}) / (\kappa \times V_R),$$

где θ_σ — доля увеличения дисперсии хроматографической зоны, V^{extra} — экстраколоночный объем или объем пробы, мл, V_R — удерживаемый объем для пика компонента, по которому производится расчет, N — эффективность, κ — эмпирический коэффициент ($\kappa \approx 1-10$), измеряемый опытным путем.

Увеличение дисперсии можно напрямую связать с потерей доли эффективности θ_N :

$$\theta_N = 1 - 1/(1 + \theta_\sigma)^2.$$

Чтобы понять, почему влияние экстраколоночных объемов проявляется на колонках небольшого диаметра (микроколонках) при неболь-

шом удерживании, приведем зависимость к иному виду. Учитывая, что $N = L/H$ и $V_R = V_M \times (1 + k') = L \times (\pi/4) \times \varepsilon_m \times d_c^2$, получим:

$$\theta_\sigma = V^{\text{extra}} / (\kappa \times \sqrt{H} \times (\pi/4) \times \varepsilon_m \times d_c^2 \times (1 + k') \sqrt{L}).$$

Таким образом, влияние экстраколоночного объема растет обратно пропорционально квадрату диаметра колонки $\theta_\sigma \sim 1/d_c^2$ и обратно пропорционально фактору удерживания $\theta_\sigma \sim 1/(1 + k')$. Также оно немного увеличивается при уменьшении длины колонки $\theta_\sigma \sim 1/\sqrt{L}$ и в целом становится более заметным для более эффективных упаковок $\theta_\sigma \sim 1/\sqrt{H}$.

Таким образом, для работы с микроколонками применяют детекторы с объемом ячейки менее 10 мкл, обычно от 1 до 5 мкл. Если работа на микроколонке ведется в изократическом режиме, то нежелательно вводить слишком большой объем пробы, более 5 мкл.

Оговорка про изократический режим очень важна. Дело в том, что в градиентном режиме можно вводить и достаточно большие объемы пробы. Потеря эффективности компенсируется при помощи техники проведения градиентного элюирования, которое позволяет сужать и концентрировать хроматографическую зону прямо на колонке.

В качестве примера можно привести случай, когда при вводе 100 мкл пробы на 80×2 колонку в градиентном режиме достигалось отличное разделение — а ведь объем пробы здесь равен половине объема колонки.

Некоторые детекторы очень хорошо совместимы с микроколонками, к примеру, масс-спектрометрические детекторы. В то же время, некоторые детекторы практически несовместимы с микроколонками. Так, объем ячейки чувствительного рефрактометрического детектора составляет 30 мкл, из-за чего он вряд ли может использоваться в сочетании с колонками небольшого диаметра.

Вклад в дисперсию хроматографической зоны для различных подводящих капилляров одинакового объема неодинаков. Он увеличивается пропорционально квадрату радиуса и квадратному корню из длины капилляра. Однако, чрезмерное уменьшение радиуса трубки по сравнению с внутренним диаметром колонки также вредно: резкое изменение скорости потока при переходе от колонки к соединительной трубке может вносить дополнительный вклад в дисперсию за счет увеличения турбулентности потока.

Оптимальный радиус можно оценить по формуле:

$$r^4 \approx l \approx 6 \times \theta_\sigma^2 \times D_m \times \varepsilon_m \times (1 + k') \times d_c^2 \times L \times t_R / N,$$

где r — оптимальный радиус капилляра, см, l — длина капилляра, см, θ_σ^2 — квадрат доли дополнительной дисперсии, можно считать $\theta_\sigma^2 \approx$

$= 0,0001$, D_m — коэффициент диффузии в жидкой фазе, выраженный в $\text{см}^2/\text{с}$, ε_m — пористость упаковки, k' — фактор емкости пика, d_c — диаметр колонки, см, L — длина колонки, см, t_R — время удерживания компонента, с, N — эффективность колонки.

Для колонки $250 \times 4,6$ расчет дает $r \approx 0,05\text{--}0,1$ мм. При переходе к колонкам меньших диаметров радиус капилляра следует уменьшать пропорционально $1/\sqrt{d_c}$, то есть для колонки 250×2 оптимальный радиус составит $0,03\text{--}0,075$ мм. Все капилляры с указанными радиусами коммерчески доступны. Можно отметить, что потери эффективности за счет подводящих капилляров таких радиусов очень невелики.

4.2.2. Способы сокращения времени анализа

Выразим время анализа через длину колонки L , линейную скорость потока u и фактор удерживания последнего компонента k' :

$$t = t_0 \times (1 + k') = L \times (1 + k')/u.$$

Из уравнения видно, что время анализа можно сократить, уменьшая длину колонки, увеличивая скорость потока, а также уменьшая удержание компонентов.

Уменьшение длины колонки L . Время анализа сокращается пропорционально уменьшению длины хроматографической колонки $t \sim L$. Ценой является такая же пропорциональная потеря эффективности $N \sim L$.

Счастью, при этом перепад давления также уменьшается $\Delta P \sim L$. Образувавшийся запас по давлению можно использовать двумя путями:

- 1) для дальнейшего сокращения времени анализа,
- 2) для компенсации потерь эффективности.

В первом случае необходимо дополнительно увеличить скорость потока. В результате, давление остается на прежнем уровне $\Delta P \sim L \times u$, а время анализа еще больше сократится, поскольку $t \sim L/u$. Таким образом, при фиксированном давлении уменьшение длины колонки вдвое приведет к сокращению времени анализа в 4 раза. Правда, потеря эффективности составит более 2-х раз.

Во втором случае для компенсации потери эффективности следует взять колонку, упакованную адсорбентом с меньшим диаметром частиц. Так, эффективность колонки с $L = 15$ см и 3 мкм адсорбентом практически равна эффективности колонки с $L = 25$ см и 5 мкм адсорбентом при том, что при работе на 15 см колонке разделение занимает в два раза меньше времени.

Увеличение скорости потока u . Время анализа сокращается обратно пропорционально увеличению скорости потока $t \sim 1/u$.

Однако, если зафиксировать длину колонки, то перепад давления на колонке увеличится пропорционально возрастанию скорости потока $\Delta P \sim u$. Кроме того, как следует из зависимости Ван-Деемтера для высоких скоростей $H = A + C \times u$, при увеличении скорости удельная эффективность будет уменьшаться. Особенно заметно это будет для адсорбентов с крупными частицами и/или медленной кинетикой сорбции-десорбции.

До определенного предела удерживать давление можно путем снижения вязкости элюента за счет увеличения температуры $\Delta P \sim u \times \eta(T)$. При повышении температуры надо помнить, что следствием является уменьшение удерживания k' . Соответственно, для того, чтобы хроматограмма не изменилась, необходимо корректировать состав элюента, уменьшать его элюирующую силу.

Способ снижать давление за счет повышения температуры имеет несколько ограничений.

Самое непредсказуемое и поэтому неприятное — это зависимость селективности разделения от температуры. Вид хроматограммы при повышении температуры может серьезно измениться. Особенно хорошо это заметно в тех случаях, когда механизм удерживания является смешанным.

Второе ограничение касается фаз на основе силикагеля. Выше 50°C процесс гидролиза силикагеля заметно ускоряется, что начинает сказываться на времени жизни колонки. Одним словом, для силикагеля $50\text{--}60^\circ\text{C}$ — это разумный предел. Полимерные, углеродные адсорбенты могут выдерживать и большие температуры до 200°C .

Третье ограничение — это температура кипения компонентов элюента. Градусов за двадцать-тридцать до точки кипения начинаются проблемы с детектированием. Давление в кювете детектора невелико, 1–2 атм, так что при определенной температуре в ней начинают возникать пузырьки газовой фазы. На хроматограмме это выглядит как резкое возрастание шума. С этим явлением вполне можно бороться, соединив капилляр для слива элюата со специальным уплотнительным винтом, который «подпирает» поток элюата и держит давление в ячейке детектора на уровне 2–3 атм. При этом надо помнить, что кювета имеет собственный предел прочности в 5–10 атм, и не перестараться.

Уменьшение удерживания k' . Наконец, уменьшение удерживания компонентов может быть самостоятельным инструментом сокращения времени анализа.

Здесь надо хорошо понимать, что при правильно отрегулированном удерживании уменьшать его никак нельзя — критические пары просто

перестанут разделяться. Сама возможность уменьшать удерживание без последствий для разделения является признаком того, что подвижная фаза изначально имела слишком слабую элюирующую силу и ее надо было скорректировать в сторону увеличения.

Компания ООО «Физлабприбор», эксклюзивный представитель в СНГ японской компании YMC, представляет новое поколение аналитических колонок YMC-UltraHT для сверхбыстрой жидкостной хроматографии (ultra-fast liquid chromatography, UFLC).

Новая фаза представляет собой 2 мкм полностью пористые частицы сверхчистого силикагеля золь-гель типа C18 с прививкой. Оптимизированные гидродинамические характеристики фазы позволяют выполнять высокопроизводительные анализы не только на специализированном оборудовании для хроматографии сверхвысокого давления (UPLC), но и на стандартных хроматографических системах. При работе на колонке 50 × 2 мм время анализа составляет от 1–3 мин при давлении не более 300–350 атм.

Тестовое разделение (скополамин, атропин, цинхонин, хинин, ди-гидрохинин) на этой колонке при скорости потока 0,6 мл/мин и температуре 40 °С занимает 2 мин при давлении порядка 300 атм. Анализ на меламинам требует всего 2 мин, разделение смеси водорастворимых витаминов (пиридоксин гидрохлорид, аскорбиновая кислота, никотинамид, пантенол и др.) может быть выполнено за 60 с.

Поскольку 50 × 2 YMC-UltraHT является микроколоной, ее применение оптимально при использовании фотометрических детекторов с микрокюветами объемом 3 мкл и менее. Если на хроматографе установлена стандартная 10 мкл кювета для работы с аналитическими колонками диаметра 4–4,6 мм, то в случае перехода на разделение в режиме сверхбыстрой хроматографии ее следует заменить на микрокювету.

Подробнее на сайте эксклюзивного представителя YMC ООО «Физлабприбор» www.fizlabpribor.ru¹.

4.2.3. Способы повышения чувствительности анализа (уменьшения предела определения целевых соединений)

При определении следовых количеств соединений задача оптимизации состоит, в том числе, и в том, чтобы высота пика компонента в достаточной

¹ На правах рекламы.

мере была выше уровня шумов детектора. Только в этом случае количественный анализ можно провести с приемлемой точностью (см. разд. 3.4.2).

Для отношения сигнал/шум можно записать:

$$SN = h/Z = S \times C_{\max} / Z = (S \times C_{\text{sample}}) / (R \times Z),$$

где h — высота пика, Z — высота шума, S — чувствительность детектора по данному веществу, C_{\max} — максимальная концентрация компонента в хроматографической зоне (в пике), C_{sample} — концентрация компонента в пробе, R — разбавление. Эта величина показывает, во сколько раз максимальная концентрация компонента в пике меньше концентрации компонента в пробе $R = C_{\max} / C_{\text{sample}}$.

Шум и чувствительность детектора будем здесь считать константами. Тогда отношение сигнал/шум можно улучшить, либо напрямую увеличив концентрацию компонента в пробе $SN \sim C_{\text{sample}}$, либо уменьшив разбавление пробы в колонке $SN \sim 1/R$.

Увеличение концентрации компонента в пробе более действенно, однако, несмотря на кажущуюся простоту, не все так легко осуществимо. Фактически, чтобы увеличить C_{sample} , необходимо в меньшем объеме жидкости растворить больше образца либо упарить из раствора образца больше растворителя. Почему это может быть непросто? Все сложности, так или иначе, связаны с ограниченной растворимостью — либо непосредственно самого образца, либо сухого остатка (если методика содержит стадию подготовки пробы). В первом случае задача сводится к растворению как можно большего количества образца в подходящем для приготвления пробы растворителе (см. разд. 1.5).

Во втором случае проба является продуктом стадии подготовки пробы. Здесь C_{sample} можно повысить, либо увеличив количество аналита в сухом остатке (то есть провести концентрирование), либо сократив в сухом остатке долю компонентов матрицы (то есть провести очистку), чтобы потом суметь перерастворить сухой остаток в меньшем объеме растворителя.

Однако, при слишком высокой концентрации C_{sample} вещества в пробе колонки может наступить перегруз колонки. Хроматографическая колонка обладает вполне определенной емкостью по веществу, то есть физически не может адсорбировать больше определенного количества вещества. При перегрузе колонки все хроматографические пики уширяются (то есть уменьшается эффективность разделения). Времена удерживания при перегрузе также уменьшаются.

Устойчивость колонки к перегрузу определяется в первую очередь количеством адсорбента в сечении колонки и емкостью адсорбента (она равна максимально возможному адсорбированному количеству

какого-либо вещества на единицу массы адсорбента). На колонку можно нанести тем больше массы образца $m_{\text{sample}} = C_{\text{sample}} \times V_{\text{sample}}$, чем больше квадрат диаметра колонки d_c^2 и больше емкость адсорбента. Бывает так, что сравнительно невысокая емкость адсорбента накладывает серьезное ограничение на m_{sample} : так, на обращенную фазу C18 можно нанести лишь десятую часть того количества вещества, которое выдержала бы фаза с немодифицированным силикагелем.

Чисто хроматографический подход к увеличению отношения сигнал/шум состоит в уменьшении разбавления пробы в хроматографической колонке $SN \sim 1/R$. Рассмотрим основные способы уменьшения разбавления R .

Разбавление можно представить в следующем виде:

$$R = (2,5 \times V_R) / (V_{\text{sample}} \times \sqrt{N}) \approx 2 \times (1/V_{\text{sample}}) \times \varepsilon_m \times d_c^2 \times (1 + k') \times \sqrt{L} \times \sqrt{H},$$

где V_{sample} — объем вводимой пробы, V_R — объем удерживания, H — высота теоретической тарелки, ВЭТТ.

Подставляя в эту зависимость выражение для ВЭТТ Халаша и Нефа $H = \lambda \times u^{0.4} \times d_p^{1.6}$, получаем:

$$R = 2 \times (1/V_{\text{sample}}) \times \varepsilon_m \times d_c^2 \times (1 + k') \times \sqrt{L} \times \sqrt{\lambda} \times u^{0.2} \times d_p^{0.8}.$$

Увеличение объема пробы V_{sample} . Если необходимо уменьшить разбавление, то самое простое, что можно сделать, это просто ввести больший объем пробы. Недостаток этого метода заключается в том, что при введении большого объема пробы теряется эффективность разделения, поскольку проба ведет себя как экстраколоночный объем. Это особенно хорошо заметно при применении микроколонок с диаметром 2 мм и менее.

Выбор менее длинной колонки с более мелким адсорбентом. Согласно приведенной зависимости для D , разбавление уменьшится, если разделение проводить на менее длинной колонке с более мелким адсорбентом $R \sim \sqrt{L} \times d_p^{0.8}$. Это вполне разумная рекомендация. Так, при переходе от колонки $250 \times 4,6$, заполненной адсорбентом зернением 5 мкм, к колонке $150 \times 4,6$ с адсорбентом зернением 3 мкм разбавление уменьшается примерно в 2 раза.

Уменьшение удерживания k' . Удерживание компонентов можно уменьшить, что для сильно удерживаемых компонентов приведет к практически пропорциональному сокращению времени анализа $t \sim (1 + k')$ и, соответственно, разбавления $R \sim (1 + k')$. Уменьшения удерживания можно добиться либо увеличением элюирующей силы подвижной фазы, либо повышением температуры.

При уменьшении удерживания разрешение также уменьшается $R_s \sim k'/(k' + 1)$, причем для слабо удерживаемых компонентов в значительно большей степени, чем для сильно удерживаемых. Таким образом, если на хроматограмме при $k' < 5$ имеются критические пары пиков, разрешение которых $R_s < 1,2$, то удерживание, очевидно, уменьшать нельзя.

Вообще говоря, существует еще один способ уменьшить разбавление, который состоит в сокращении диаметра колонки $R \sim d_c^2$. Но, поскольку $R = (2,5 \times V_R) / (V_{\text{sample}} \times \sqrt{N})$, сокращение диаметра колонки означает уменьшение удерживаемого объема V_R , что не более эффективно, чем простое увеличение объема пробы V_{sample} на прежней колонке с большим диаметром.

4.3. Алгоритмы оптимизации хроматографического разделения

Оптимизация разделения может осуществляться как с целью уменьшения времени, затрачиваемого на разделение, так и для достижения необходимого разрешения пиков на хроматограмме. Трендом современной жидкостной хроматографии, безусловно, является курс на сокращение времени анализа. Поэтому с самого начала сформулируем задачу оптимизации как предельное сокращение времени анализа при сохранении минимально необходимого разрешения и при доступном давлении в жидкостной системе.

При оптимизации имеет смысл соблюдать определенный порядок действий:

- 1) подобрать оптимальную селективность разделения α и удерживание k' ,
- 2) определить необходимую величину минимальной эффективности N_{min} , обеспечивающей заданное разрешение R_{min} (при данной селективности α),
- 3) подобрать размеры колонки и скорость потока элюента.

Селективность хроматографической системы является ключевым фактором, влияющим на разделение. Сложность разделения очень быстро уменьшается с ростом селективности (см. разд. 1.3.2). Удачно подобранная селективность значительно снижает требования к минимальной эффективности, необходимой для обеспечения заданного разрешения.

Если выбор селективности, фактически, означает выбор неподвижной фазы и состава подвижной фазы, то выбор удерживания k' означает выбор соотношения компонентов подвижной фазы. Удерживание надо отрегулировать таким образом, чтобы аналиты по возможности попадали в наиболее оптимальный диапазон $2 < k' < 5$ (для колонки $250 \times 4,6$ мм при

скорости потока 1 мл/мин он примерно соответствует диапазону времен удерживания $7,5 \text{ мин} < t_R < 15 \text{ мин}$.

Если работа ведется строго по методике (на определенном элюенте и на определенной неподвижной фазе), то селективность α и удерживание k' уже заданы.

На втором этапе необходимо понять, какая минимальная эффективность N_{\min} нужна для обеспечения приемлемого разрешения R_{\min} . Для этого, во-первых, надо представлять, разделение какой пары пиков на хроматограмме является наиболее критичным. Допустим, мы определились с такой парой (будем называть ее просто критической парой). Тогда при минимальной необходимой эффективности разрешение критической пары должно удовлетворять некоторому заданному значению. Например, достаточно жесткие требования к разделению критических пар предъявляются в фармацевтике $R_{\min} \geq 1,2$.

Сразу несколько комментариев. Во-первых, при выборе минимальной эффективности нельзя ориентироваться на максимальную, «паспортную» эффективность колонки. Надо использовать реальную эффективность, измеренную по самому широкому пику критической пары. Во-вторых, не стоит забывать, что критической парой также можно считать первый пик интересующего нас компонента и ряд системных пиков в начале хроматограммы (если они есть).

Таким образом, к выбору размера колонки и условий хроматографирования надо подходить, зная:

- хроматографическую систему (неподвижную и подвижную фазы), то есть селективность α и удерживание k' ,
- критическую пару, ее минимальное требуемое разрешение R_{\min} и минимальную необходимую для этого эффективность разделения N_{\min} ,
- также, вообще говоря, надо представлять себе, какое максимальное давление ΔP_{\max} мы можем себе позволить при работе на данном хроматографе.

Комментарий про максимальное давление ΔP_{\max} . Мне кажется, что этот параметр больше зависит от психологии человека, чем от каких-то рациональных доводов. В принципе, при верхнем пределе стандартного насоса в 400 атм стараются работать при давлении не сильно выше 200 атм.

Наконец, можно переходить к подбору размеров колонки и условий хроматографирования. Для этой стадии задача оптимизации будет выглядеть так: предельно сократить время t , обеспечив необходимую минимальную эффективность N_{\min} и уложившись в максимально возможное давление ΔP_{\max} . Последний ресурс, которым мы обладаем, это запас по давлению. Последние параметры, которыми можем оперировать: размер частиц адсорбента, длина колонки и скорость потока.

Можно составить всего три комбинации действий, которые приведут к ускорению анализа при фиксированной эффективности. Привожу их в порядке увеличения «потребления» основного теперь ресурса — запаса по давлению:

- 1) надо уменьшать диаметр частиц адсорбента и одновременно уменьшать длину колонки;
- 2) надо увеличивать скорость потока и умеренно уменьшать диаметр частиц адсорбента;
- 3) надо увеличивать скорость потока и умеренно увеличивать длину колонки.

Давайте предположим, что мы способны плавно изменять все имеющиеся параметры. Тогда первым делом выполним пункт 1: выберем адсорбент с минимальным (в разумных пределах) диаметром частиц. Сейчас это адсорбенты с диаметром 2,7–3 мкм. Далее, сократим длину колонки до предела, пока не достигнем минимальной приемлемой эффективности N_{\min} . Теперь смотрим на давление. Остался запас? Если остался, то идем дальше. Пункт 2 мы уже выполнить не сможем, так как уже в самом начале выбрали самый мелкий адсорбент, который еще подходит для рутин. Тогда переходим к пункту 3: постепенно увеличиваем скорость потока, плавно компенсируя потерю эффективности увеличением длины колонки. Поверьте — на стандартной системе с пределом давления в 400 атм так долго не протянешь. Запас по давлению, если он остался, будет «съеден» мгновенно.

Конечно, для рутинных определений это в общем случае совершенно не критично, результат и так будет очень хорош. Но ради интереса можно продолжить этот мысленный эксперимент; для этого нам понадобится (также мысленная) ВЭЖХ система ультравысокого давления (ultra-high pressure liquid chromatography, UPLC). Посмотрите на рис. 4.3. На рисунке можно увидеть экспериментальные зависимости времени анализа (в логарифмической шкале) от эффективности разделения — при фиксированном диаметре частиц (2,7 мкм). Наш мысленный эксперимент — это движение по вертикальной линии вниз, с сохранением необходимой эффективности, в направлении уменьшения времени анализа. В процессе мы увеличиваем длину колонки в полтора раза (от 10 до 15 см), а скорость потока — в 3 раза. В результате, время анализа уменьшается в $3/1,5 = 2$, то есть в два раза, до 5 мин, а давление возрастает в $3 \times 1,5 = 4,5$, то есть в четыре с половиной раза, примерно от 100 до 500 атм. Таким образом, за ускорение анализа вдвое мы заплатили почти 400 атм. Вот зачем необходимо знать максимально допустимое давление: увеличение давления позволяет сокращать время анализа в качестве «последнего довода королей».

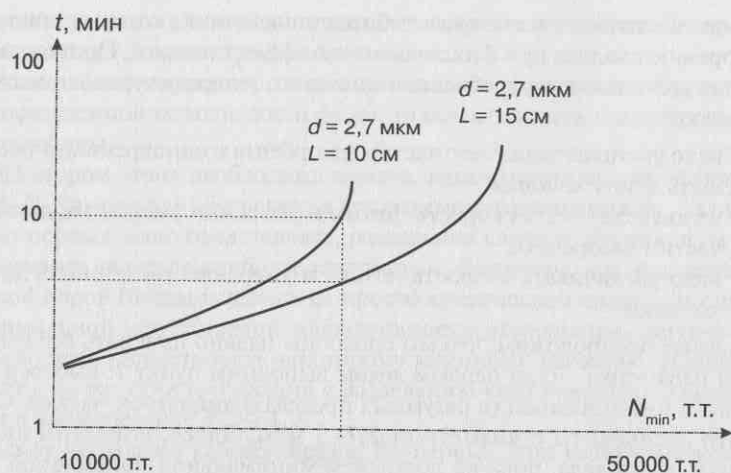


Рис. 4.3. Зависимости времени анализа (в логарифмической шкале) от эффективности разделения

Возможно, приведенные выкладки были слишком богаты теорией. Например, я очень сомневаюсь, что в реальности кто-то действительно измеряет N_{\min} и минимизирует время анализа, используя зависимости $t(N_{\min}, L, d_p)$. Все, как правило, происходит без расчетов, уже на уровне интуиции. Поэтому, чтобы непосредственно ощутить процесс оптимизации, предлагаю перейти от теории к двум очень простым практическим примерам. Рассмотрим пару пиков. В первом примере разрешение будет фиксированным, причем при стартовых условиях оно будет предельно малым. Во втором примере разрешение с самого начала будет достаточно большим, и мы сможем его варьировать.

Пример 1. Мы получили хорошее разрешение критической пары ($R_s = 1,2$) на колонке $250 \times 4,6$ с 5 мкм адсорбентом при скорости 1 мл/мин при комнатной температуре за 15 мин и давлении 100 атм. Запаса по разрешению, как уже было сказано, у нас нет. Как можно сократить время анализа?

Сократим длину колонки до 150 мм, а потерю эффективности компенсируем тем, что возьмем колонку с 3 мкм адсорбентом. Получим то же разделение, но за 9 мин. Кстати, при этом высота пика и, соответственно, отношение сигнал/шум увеличатся в 2 раза (за счет уменьшения разбавления). Немного подрастет давление, но не слишком сильно.

Для 3 мкм адсорбента коэффициент C в уравнении Ван-Деемтера значительно меньше, чем для 5 мкм, поскольку с случае 3 мкм адсорбента мас-

сопередача происходит быстрее. Это значит, что скорость потока можно увеличивать в определенных рамках вообще практически без потери эффективности. Увеличим скорость потока до 1,5 мл/мин, а колонку будем термостатировать при 40 °С. Давление, которое при комнатной температуре могло подняться и до 250 атм, при 40 °С будет находиться в пределах 200 атм (по причине уменьшившейся вязкости элюента). Эффективность ничуть не пострадает. А вот время анализа будет составлять уже 6 мин.

Боюсь, что при изначальном отсутствии запаса по разрешению величину 6 мин уже не уменьшить. Конечно, применяя новейшие адсорбенты при тщательно подобранных условиях, все-таки можно «подвинуть» ее еще немного, минут до 4–3. Но, в принципе, результат и так неплох: производительность анализа практически «на ровном месте» удалось увеличить втрое.

Пример 2. Теперь пусть запас по разрешению будет достаточно большим, например, $R_s = 2,5$. Возможностей — масса! Для начала, от колонки длиной 150 мм перейдем на колонку длиной 50 мм (все колонки с 3 мкм адсорбентом). Это уже приведет к сокращению времени анализа от 6 до 2 мин. Но запас еще будет — и по эффективности (разрешение будет составлять порядка $R_s \approx 1,45$), и по давлению ($\Delta P \approx 70$ атм). Можно увеличить скорость потока вдвое, то есть до 3 мл/мин. Время анализа тогда составит 1 мин.

Проводя этот небольшой умственный эксперимент, я руководствовался определенной целью, и сейчас она станет ясна. К чему мы пришли в итоге эксперимента? К тому, что без запаса по разрешению увеличили производительность анализа в 3 раза, а с запасом по разрешению — в 15 раз.

А какой параметр критично влияет на разрешение? Это — селективность α . Даже при небольшом увеличении α разрешение может увеличиться в разы, а производительность анализа, в чем мы уже могли убедиться, даже на порядок. Поэтому основная идея оптимизации в жидкостной хроматографии как раз и состоит в управлении селективностью.

ГЛАВА 5

ВИДЫ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ. УПРАВЛЕНИЕ СЕЛЕКТИВНОСТЬЮ РАЗДЕЛЕНИЯ. НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

5.1. Неподвижные фазы (НФ) для жидкостной хроматографии

5.1.1. Архитектура (физическая структура) современных неподвижных фаз (НФ) для жидкостной хроматографии

Неподвижные фазы для ВЭЖХ продолжают совершенствоваться. За последние десять-двадцать лет наряду с более совершенными аналогами уже известных типов неподвижных фаз стали применяться и принципиально новые адсорбционные материалы, исследование хроматографических свойств которых только началось.

По своей архитектуре (физической структуре) НФ для жидкостной хроматографии могут представлять собой: пористые частицы, непористые частицы, перфузионные частицы, макропористые (бипористые) монолиты и микропористые монолиты.

Большинство современных неподвижных фаз построено на основе пористых частиц. Природа пористого материала основы может быть как неорганической (силикагель, окись циркония, окись титана и др.), так и органической (синтетические полимеры, чаще полистирол-дивинилбензол или полиметакрилат).

Реальную конкуренцию пористым частицам в ближайшее время могут составить пористые монолиты. Они также могут быть как неорганическими, на основе силикагеля, так и органическими, например, на основе полистирола-дивинилбензола.

Немодифицированные адсорбенты-основы могут непосредственно применяться как неподвижные фазы. Например, силикагель напрямую

применяют для нормально-фазовых разделений. Но даже самые лучшие адсорбенты не могут быть универсальными и обеспечивать всего спектра необходимых адсорбционных свойств. Поэтому адсорбенты-основы химически модифицируют и таким образом получают новые неподвижные фазы с новыми свойствами.

Существует несколько способов химического модифицирования адсорбентов-основ.

Новая неподвижная фаза может быть получена в результате взаимодействия химически реакционных функциональных групп адсорбента-основы с каким-либо реагентом. Такую реакцию часто называют *прививкой*.

Подобным способом получают большинство неподвижных фаз на основе силикагеля. Прививка новой химической фазы, как правило, осуществляется согласно следующей реакции:

Адсорбент-Si-OH + Cl-Si(CH₃)₂-R = Адсорбент-Si-O-Si(CH₃)₂-R, где R — какой-либо заместитель. Широко распространены обращенные фазы, в которых R = C₁₈H₃₇ (марка C18), или C₈H₁₇ (марка C8). Для полярных фаз на основе силикагеля R = (CH₂)₃-NH₂ (аминофаза), (CH₂)₃-CN (нитрильная фаза).

Новую фазу можно создать, модифицируя уже привитую фазу; к примеру, целый спектр «амидных» фаз с различными свойствами можно получить из аминофазы по реакции:



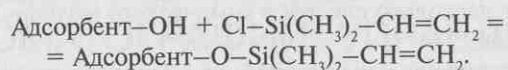
Ввести новые функциональные группы можно и в полимерный адсорбционный материал. Такие реакции в химии высокомолекулярных соединений называют *полимер-аналогичными превращениями*.

Так, полимерные материалы на основе полистирола могут сульфироваться с образованием сульфокатионита. Они также могут хлорметилироваться; реакция хлорметилированного полимера с аммиаком приводит к образованию аминофазы на полимерной основе. На основе аминофазы, как было показано, можно получить большое разнообразие иных неподвижных фаз. Существуют и другие методы введения функциональных групп в полимерные материалы, основанные, например, на реакции Фриделя-Крафтса.

Исходная основа может быть покрыта полимерным слоем (polymer-grafted film) с принципиально новыми адсорбционными свойствами. Для этой цели применяют основы с функциональными группами, способными вступать в реакцию полимеризации. Как правило, для этих целей при-

меняют полимерные основы, приготовленные на базе дивинилбензола, поскольку они имеют достаточно много остаточных двойных связей.

Но покрыть полимерной пленкой можно и неорганические адсорбенты-основы. Активные функциональные группы, способные инициировать полимеризацию, можно ввести по реакции:



После получения материала с нанесенной полимерной пленкой в реакционную смесь добавляется соединение, сшивающее полимерные цепи.

Непористые и макропористые адсорбенты-основы с заряженными группами на поверхности могут быть обработаны суспензией коллоидных частиц противоположно заряженного полимерного материала. В этом случае полимерная пленка (electrostatic-agglomerated film) удерживается на поверхности основы за счет сильных электростатических взаимодействий. Заряд частиц совпадает с зарядом полимерной пленки.

В результате, на основе непористых частиц можно получить ионообменные материалы с хорошей удельной эффективностью, хотя и не очень высокой емкостью. При синтезе фаз для ионной хроматографии в качестве основ применяют иониты на базе макропористых (1000–3000 Å) полистирол-дивинилбензольных материалов.

Материалы, приготовленные по приведенной технологии, иногда называют *пелликулярными* (pellicular), дословно — «пленочными». Некоторые современные ионообменные фазы принадлежат к этому типу материалов.

5.1.2. Особенности строения современных обращенно-фазовых НФ на основе силикагеля. Способы улучшения химической инертности, гидролитической стабильности, устойчивости к фазовому коллапсу. Высокий и низкий ценовые сегменты для обращенных фаз. Тестирование неподвижных фаз, тестовые смеси для обращенно-фазовых НФ. Крэш-тесты

Разработка неподвижных фаз для обращенно-фазовой хроматографии на основе силикагеля идет по пути решения сразу нескольких практических задач:

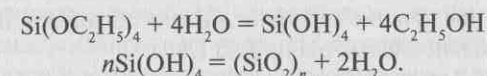
- повышения их химической инертности,
- повышения их гидролитической стабильности,

- синтеза фаз, полностью совместимых с 100% водными ПФ (без добавления неполярной добавки),
- синтеза фаз для разделения сильногидрофобных соединений.

Под «химической инертностью» фаз на основе силикагеля понимают отсутствие нежелательных, сильных и замедленных, взаимодействий адсорбатов с «активными» адсорбционными центрами на поверхности адсорбента. Подобные взаимодействия являются причиной уширения и искажения формы хроматографических пиков ионных соединений, особенно азотсодержащих оснований. Типичные «активные» центры силикагеля — это примесные ионы металлов, а также появляющиеся под их влиянием силанольные группы повышенной кислотности (так называемые «активные силанолы»).

Гидролитическая стабильность фазы на основе силикагеля определяет «время жизни» хроматографической колонки. Любой силикагель со временем гидролизует, растворяется, что приводит к выходу колонки из строя. Очень быстро процесс растворения идет в щелочной среде, поэтому фазы на основе силикагеля нельзя применять при pH > 7. Но и при подкислении элюентов, при добавлении в элюент солей гидролитические процессы также ускоряются. Более того, эти процессы активно катализируются примесными ионами металлов, которые содержит в себе силикагель.

Таким образом, для улучшения химической инертности и гидролитической стабильности силикагельных фаз необходимо уменьшить содержание в последнем примесных ионов металлов. В настоящее время этого эффекта добиваются путем синтеза силикагеля по *золь-гель* (sol-gel) технологии. В отличие от силикагеля, получаемого по «традиционной» технологии — осаждением геля кремниевой кислоты из водного раствора силикатов, в золь-гель технологии силикагель синтезируется каталитической поликонденсацией силоксанов в водной среде:



Главная отличительная черта золь-гель силикагеля — крайне низкое содержание примесей металлов, на два-три порядка ниже, чем в силикагеле, получаемом по «традиционной» технологии. Кроме того, золь-гель силикагель отличается и по своей физической структуре (см. табл. 5.1). Золь-гель силикагели могут быть приготовлены с различным размером пор и величиной внутренней удельной поверхности.

Существуют и другие способы увеличить гидролитическую стабильность и химическую инертность обращенных фаз на основе силикагеля.

Таблица 5.1. Характеристики силикагелей

	Удельная поверхность, м ² /г	Средний размер пор, А	Примесь кальция, мкг/г	Примесь железа, мкг/г
Традиционная	Около 600	60–80	До 450	До 300
Золь-гель	Около 300	100–120	< 10	< 10

Так или иначе, все они связаны с технологией прививки C8 или C18 реагентов на основу-силикагель.

«Классическим» способом можно считать *эндкэппинг* (end-capping). После прививки C8 (или C18) реагента около двух третей силанольных групп остается свободными, не прореагировавшими. Они «закрываются» (эндкэппируются) другим, низкомолекулярным реагентом, часто триметилхлорсиланом или диметилдихлорсиланом.

Еще один способ заключается в прививке C16 или C18 реагентов, имеющих какую-либо полярную группу, как правило, амидную или карбамидную. Прививка проводится таким образом, чтобы полярная группа (она называется polar-embedded group) находилась у поверхности адсорбента и «перекрывала доступ» к активным центрам силикагельной основы. Главная цель подобной прививки — улучшение химической инертности фазы.

Третий способ состоит в прививке C18 или C8 реагентов не в виде монохлорида $\text{Cl-Si}(\text{CH}_3)_2\text{-R}$, а в виде дихлорида $\text{Cl}_2\text{-Si}(\text{CH}_3)\text{-R}$. Если прививать монохлорид, то одна молекула реагента четко присоединится к одной силанольной группе силикагеля — в результате получится «классическая», *мономерная C18* прививка. В случае применения дихлорида концевые хлоры могут гидролизироваться и вступать в реакцию полимеризации. В результате получается *полимерная C18* прививка. Полимерный C18 слой «закрывает» силикагель и способствует значительному замедлению процесса гидролиза, растворения адсорбента. Главная цель полимерной C18 прививки — увеличение «времени жизни» обращенной фазы при работе в области сильноокислых pH от 3 до 1,5.

На элюентах с большой долей водной основы, 90% и более, обращенно-фазовое разделение может оказаться «жертвой» крайне неприятного эффекта — *фазового коллапса*. Его признаки таковы: в течение небольшого времени, порядка нескольких часов, поначалу отличная хроматограмма начинает «плыть». Удерживание всех компонентов резко падает, впрочем, как и эффективность. Все разделение превращается в один широкий неудариваемый пик. Если промыть колонку ацетонитрилом, а затем вновь повторить анализ, то разделение снова будет наблюдаться, но оно опять «поплывет».

Причина фазового коллапса заключается в том, что неполярная поверхность C18 фазы перестает смачиваться элюентом, обедненным органическим растворителем, и он просто перестает проникать в поры адсорбента. Соответственно, поры перестают работать, что и приводит к резкому уменьшению удерживания.

Для того, чтобы неполярная фаза не страдала от фазового коллапса, ее поверхность все-таки должна содержать какое-то минимальное количество полярных групп. Есть два основных подхода к синтезу такого рода НФ: строгий технологический контроль «классического» эндкэппинга неполярными реагентами и применение процедуры полярного эндкэппинга. *Полярный эндкэппинг* (polar end-capping) — эндкэппинг реагентами с полярной функциональной группой. C18 фазы с полярным эндкэппингом, действительно, полностью совместимы с 100% водными элюентами. Но у них есть два минуса, которые нивелируют это преимущество: низкое удерживание полярных соединений и дополнительный вклад нормально-фазового типа удерживания.

Смысл другого подхода, основанного на строгом контроле процесса эндкэппинга неполярными реагентами, состоит в том, чтобы оставить минимальное количество неэндкэппированных силанольных групп. Эта технология бережно охраняется фирмами-производителями; в описании таких фаз нередко можно встретить слово «proprietary», то есть химия фазы «засекречена».

И на это есть свои причины. Дело в том, что именно фазы, которые:

- обладают отличной гидролитической стабильностью,
- химически инертны, не уширяют и не искажают пики ионных органических соединений,
- устойчивы к фазовому коллапсу и при этом
- достаточно неполярны, чтобы обеспечивать отличное удерживание даже сильнополярных соединений, а также
- эндкэппированы неполярным реагентом, чтобы исключить вклад остаточных силанольных групп в удерживание (по нормально-фазовому типу), — именно такие фазы относятся к высокому ценовому сегменту.

Разумеется, с подобными фазами работать удобно. С их помощью можно осуществлять и простые, и сложные разделения. Они «прощают» многие ошибки: нередко случается, что разделения, считающиеся проблемными и требующие особого подхода, эти фазы осуществляют «в лоб», при работе на простых водно-органических элюентах без каких-либо добавок.

Более того, *крэш-тесты* (тесты на разрушение неподвижной фазы) свидетельствуют о том, что попытки сэкономить на покупке фаз низкого

ценового сегмента не оправданы, поскольку последние обладают существенно меньшим временем жизни при интенсивной эксплуатации. Соответственно, и для серийных анализов лучше применять фазы из высокого ценового сегмента.

Для того, чтобы надежно установить качество обращенно-фазовой НФ, с ней необходимо провести ряд тестов. Их можно разделить на разрушающие и неразрушающие. Только с применением разрушающих тестов (крэш-тестов) можно получить результаты для сравнения гидролитической стабильности двух или нескольких неподвижных фаз. Все другие характеристики НФ: химическая инертность, устойчивость к фазовому коллапсу, хорошее удерживание полярных соединений, наличие либо отсутствие вклада удерживания по нормально-фазовому типу — определяются при помощи различных неразрушающих тестов.

Неразрушающий тест состоит в проведении разделения в определенных условиях *тестовой смеси*: набора модельных органических соединений. Тестовая смесь и условия разделения подбираются таким образом, чтобы выявить ту или иную характеристику неподвижной фазы. Вообще, каких-либо стандартных или обязательных тестов не существует. Есть несколько общепринятых тестов, которые можно встретить в профессиональной литературе или рекламных материалах. Однако, рекламе нужно «доверять, но проверять». Поэтому хроматограммы с тестами надо не просто разглядывать в проспектах, но и воспроизводить на собственных колонках. Таким образом можно накопить собственную статистику по неподвижным фазам и выбрать среди них наиболее оптимальный для тех или иных приложений.

Поделюсь своими наработками в области тестирования обращенных фаз. Неплохим тестом является разделение фруктовых органических кислот (см. рис. 5.1). Если испытываемая колонка невысокого качества, то пики, скорее всего, будут уширены (особенно лимонная кислота); может не разделиться критическая тройка пиков лимонная-фумаровая-янтарная (другие критические пары: яблочная-изолимонная, изоаскорбиновая-уксусная).

Одновременно это и тест на совместимость со 100%-ными водными подвижными фазами. Если колонка способна страдать от фазового коллапса, то на этом разделении это будет отчетливо видно: с течением времени кислоты перестанут удерживаться, а колонка потеряет эффективность.

Хорошим тестом является разделение агликонов флавонолов: кверцетина, кемпферола и изорамнетина (элюент: ацетонитрил-вода 40 : 60, pH 2; проба — в элюенте). На качественных C18 фазах изорамнетин элюируется

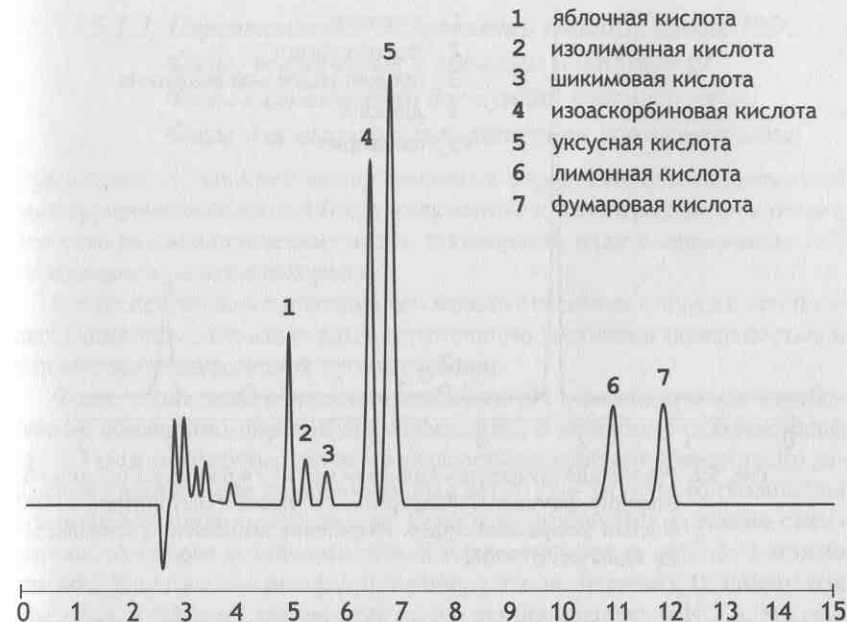


Рис. 5.1. Разделение фруктовых органических кислот на 250 × 4,6 колонке с 5 мкм обращенно-фазовым C18 адсорбентом. Элюент: 50 мМ фосфатный буфер, pH 2,6 фосфорной кислотой

после кемпферола и хорошо с ним разделяется; все пики флавонолов узкие и симметричные, анализ занимает всего несколько минут. Плохое разделение пары кемпферол/изорамнетин и асимметричные пики, скорее всего, свидетельствуют о невысоком качестве фазы. Если изорамнетин элюируется перед кемпферолом и эффективность разделения вполне приемлемая, это признак обращенной фазы с «полярной введенной группой» (polar embedded group) или с полярным эндкеппингом.

Существует множество тестов на «химическую инертность» C18 обращенных фаз, которая проявляется как отсутствие уширения и асимметрии пиков основных азотсодержащих соединений при их элюировании подвижными фазами без модифицирующих добавок: триэтиламина, диэтиламина или ион-парных реагентов. Примеры органических оснований, которые можно применять для тестирования: трициклические антидепрессанты, бета-блокеры, N-алкиланилины, природные алкалоиды и т.д. Достаточно простой тест, на мой взгляд, заключается в анализе препарата «Андипал», который содержит анальгин, фенобарбитал, дибазол и папаверин.

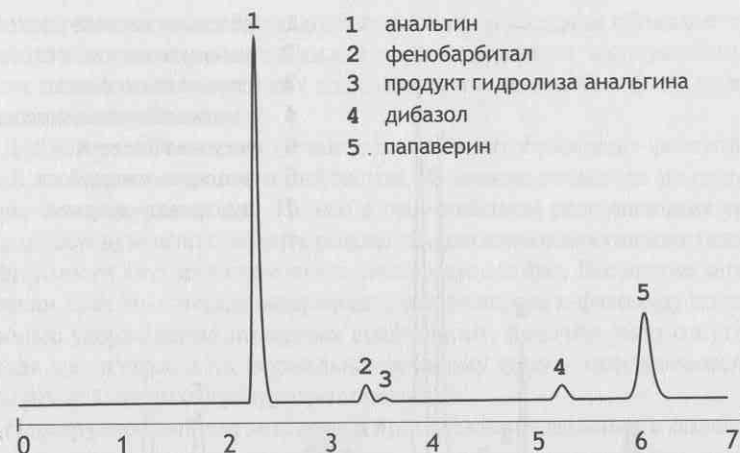


Рис. 5.2. Разделение препарата «Андипал» на $150 \times 4,6$ колонке с 5 мкм обращенно-фазовым C18 адсорбентом. Элюент: ацетонитрил-25 мМ водный фосфатный буфер. Разделение выполнено специалистами Ирбитского ХФК

На качественной, пригодной для анализа алкалоидов фазе все пики будут в достаточной мере симметричными и узкими, без затяжных «хвостов».

Компания YMC выпускает линейку неподвижных фаз YMC-Pack для протеомных разделений в режиме обращено-фазовой хроматографии. Фазы различаются химией прививки (C4, C8, C18), размером пор (от 60 до 300 Å), размером частиц (от 3 до 50 мкм). Специально для разделения белков компания YMC разработала фазу YMC-Pack Protein-RP с повышенной стабильностью к ТФУ. Для анализа полисахаридов, гликопротеинов, нуклеиновых кислот и сходных соединений (в режиме хроматофокусирования) альтернативой стандартным аминокислотам является YMC-Pack Polyamine II, устойчивая к окислению и гидролизу.

Методы разделений, разработанные на аналитических сорбентах YMC, легко масштабируются до промышленного производства. Препаративные адсорбенты YMC применяются в производстве генно-инженерных препаратов многими известными фармацевтическими компаниями, такими как Elly Lilly и Novo-Nordisk.

Подробности на сайте эксклюзивного представителя YMC ООО «Физлаприбор» www.fizlabpribor.ru¹.

¹ На правах рекламы.

5.1.3. Перспективные направления синтеза новых НФ.

Фазы, устойчивые в широком диапазоне pH.

Фазы с ограниченно доступной поверхностью.

Фазы для высокотемпературной хроматографии

Существует, по крайней мере, несколько перспективных направлений конструирования новых НФ для жидкостной хроматографии. Это значит, что есть ряд аналитических задач, с которыми даже современные НФ справляются не вполне хорошо.

К перспективным направлениям можно отнести синтез фаз: устойчивых в широком диапазоне pH, с ограниченно доступной поверхностью и для высокотемпературной хроматографии.

Фазы, устойчивые в широком диапазоне pH элюента, очень востребованы в обращенно-фазовой хроматографии. В диапазоне сильноокислых $\text{pH} < 3$ можно достичь отличного разделения соединений кислотного характера, в диапазоне сильноосновных $\text{pH} > 11$ — отличного разделения соединений основного характера. Если говорить об НФ на основе силикагеля, то вопрос устойчивости при умеренно кислых pH 1,5–3 можно считать решенным — ряд фаз, к примеру, с полимерной C18 прививкой (см. разд. 5.1.2) при аккуратной эксплуатации «держат» pH 1,5. Но при щелочном $\text{pH} > 7$ даже специальные силикагелевые фазы со временем гидролизуются, растворяются. Таким образом, говорить о силикагеле, устойчивом в щелочном pH , пока рано.

Основные надежды по созданию устойчивых в широком диапазоне pH фаз всегда возлагались на полимерные адсорбционные материалы. Однако, пока коммерчески доступные фазы с полистиролом средней сшивки хоть и устойчивы при любом pH, но по сравнению с силикагелевыми материалами серьезно проигрывают им по удельной эффективности. Определенные перспективы развития в этом направлении имеют сверхсшитые полимерные материалы.

Фазы с ограниченно доступной поверхностью, ОДП (restricted access media, RAM), применяются для анализа «грязных» проб либо без, либо с минимальной подготовкой пробы. Особенно актуальны такие фазы при анализе биологических проб, которые содержат большое число загрязняющих соединений белковой природы, и экологических проб, которые могут содержать гуминовые кислоты и другие природные полимеры. В перспективе же такие фазы могут найти самую широкую область применения.

Действие ОДП фаз основывается на том, что они удерживают только низкомолекулярные соединения. Высокомолекулярные соединения «проскакивают», не удерживаются, поскольку не могут либо «подойти»

к поверхности адсорбента, либо проникнуть в поры адсорбционного материала.

ОДП фазы на основе силикагеля получают двумя путями. В первом варианте после синтеза самой фазы (например, C18) на силикагеле организуется «защитная сетка» из привитого полиэтиленгликоля. Это сетка пропускает только низкомолекулярные соединения. Во втором варианте на силикагельную фазу прививают реагенты с длинной углеводородной цепочкой и полярной группой на конце (например, диольной). Такая преграда является непреодолимой для гидрофильных белков.

Весьма перспективным ОДП материалом является микропористый сверхсшитый полистирол. В этом материале нет пор как таковых, есть полимерная жесткая трехмерная сетка с характерным размером ячейки 20–30 ангстрем. Единственным минусом материала является то, что он вытесняет из пор не только полимерные, но и просто большие молекулы, особенно со структурой жесткого стержня (например, ретинол) и любые гликозиды.

Очень перспективным направлением развития жидкостной хроматографии является высокотемпературная ВЭЖХ. Повышение температуры хроматографической системы дает сразу три позитивных эффекта. Во-первых, из-за ускорения массообмена достаточно сильно возрастает удельная эффективность неподвижной фазы. Во-вторых, опять же по причине ускорения массообмена потери эффективности при увеличении скорости потока сокращаются, то есть можно ускорять разделение без риска сильно потерять в эффективности. В-третьих, вязкость любой жидкости при повышении температуры становится меньше, что приводит к уменьшению перепада давления на колонке. В результате, запас по верхнему предельному давлению увеличивается, то есть можно дополнительно увеличивать скорость потока. Одним словом, применением высоких температур можно добиться либо значительного сокращения времени анализа при фиксированной эффективности, либо увеличения эффективности при фиксированном времени анализа.

Но высокая температура порождает две технические проблемы. Первая заключается в том, что при определенной температуре элюент закипает. Это случается, естественно, в зоне наиболее низкого давления — в кювете детектора. Но с этой проблемой вполне можно бороться. В конце концов, современные кюветы выдерживают давление в несколько атмосфер, чем можно воспользоваться для увеличения температуры кипения элюента. Так, на водных подвижных фазах вполне можно работать и при 200 °С.

Главная сложность заключается в том, что большинство применяемых неподвижных фаз не могут работать при такой температуре. Наиболее уязвимы НФ на основе силикагеля. Для них разумный температурный предел составляет 50 °С.

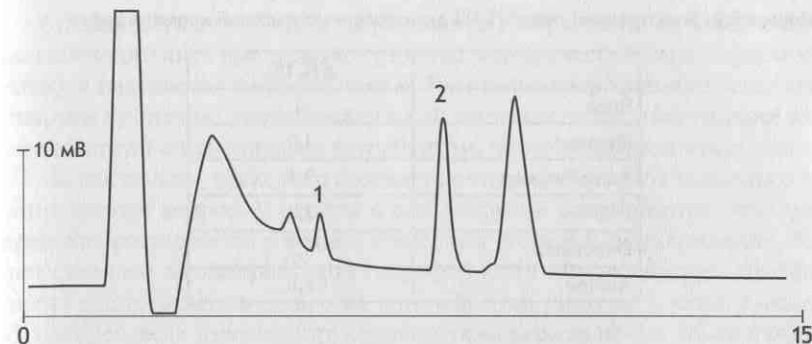


Рис. 5.3. Хроматограмма п-хлорфенола и толуола на фоне матрицы почвы. Неподвижная фаза: 250 × 4,6 Chromalite 5-HGN (сверхсшитый полистирол). Элюент: ацетонитрил-метанол-вода 45 : 50 : 5 (0,1% HClO_4): 1 — п-хлорфенол, 2 — толуол

Современные коммерчески доступные фазы на основе окиси циркония могут работать при температурах до 100–150 °С. Разумеется, каких-либо серьезных температурных ограничений вплоть до 200 °С нет у полимерных сорбентов, включая сверхсшитый полистирол и углеродные материалы.

5.2. Обращенно-фазовая хроматография (ОФ ВЭЖХ), ее преимущества и закономерности. Модель удерживания в ОФ ВЭЖХ

Типичная обращенно-фазовая хроматографическая система состоит из неполярной неподвижной фазы (НФ) и полярной подвижной фазы (ПФ).

В качестве ПФ в обращенно-фазовой хроматографии применяются системы, состоящие из воды или водного буферного раствора, основы, и смешивающегося с водой органического растворителя, неполярной добавки (см. разд. 2.2.1). Элюирующая сила ПФ возрастает с увеличением доли органического растворителя.

Элюирующая сила неполярной добавки увеличивается в ряду: метанол < ацетонитрил, этанол < ТГФ < 2-пропанол < ацетон < хлористый метилен, хлороформ. Ацетонитрил и метанол применяются чаще всего, ТГФ и длинноцепочечные спирты — значительно реже, а хлороорганические растворители — в исключительных случаях. Достаточно адекватный элюотропный ряд ϵ° (C18) для ОФ ВЭЖХ приведен в табл. 5.2.

Таблица 5.2. Элюотропный ряд ϵ° (C18) для обращенно-фазовой хроматографии

	ϵ° (C18)
Вода	0
Метанол	1,0
Ацетонитрил	3,1
ТГФ	3,7
2-пропанол	8,3
Ацетон	8,8

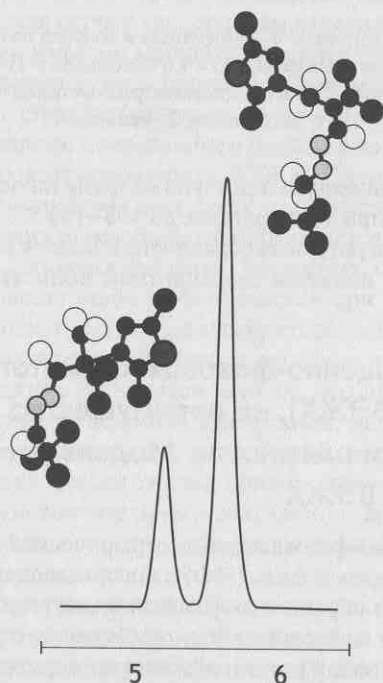


Рис. 5.4. Разделение двух изомерных соединений в обращенно-фазовых условиях. Неподвижная фаза: 250×4 LiChrospher100 RP18. Элюент: ацетонитрил-водный буфер 60 : 40. Водный буфер: 0,5 мл триэтиламина на 100 мл воды, pH 2,8 фосфорной кислотой. В соединении, которое элюируется вторым, неполярные группы расположены таким образом, что занимают большее пространство. Соответственно, гидрофобность такого изомера выше и его удержание в обращенно-фазовых условиях больше

Способность адсорбата к удерживанию в обращенно-фазовой системе можно оценить при помощи удобной эмпирической характеристики, которая называется *гидрофобностью*. Чем выше гидрофобность соединения, тем лучше оно удерживается в ОФ системах, поскольку сильнее взаимодействует с неполярным адсорбентом, чем с полярным элюентом.

Но как понять, насколько соединение гидрофобно? Есть несколько ответов на этот вопрос. В первом и самом грубом приближении, чем хуже вещество растворяется в водной среде, тем выше его гидрофобность. Количественной характеристикой гидрофобности иногда считают коэффициент распределения вещества в двухфазной системе «октанол-вода». И, наконец, если известна структурная формула соединения, то «гидрофобность» как некоторую количественную величину можно вычислить по одной из нескольких существующих аддитивных схем, суммируя известные инкременты (вклады) функциональных групп молекулы в удержание.

На практике опытный хроматографист пользуется, скорее, третьим способом оценки гидрофобности — по структурной формуле, но при этом он ничего не рассчитывает. Как и опытный химик-синтетик «со стажем», который по одной формуле предсказывает температуру плавления вещества, опытный хроматографист только по структурным формулам адсорбатов может сразу предсказать последовательность элюирования в обращенно-фазовой системе — все инкременты различных функциональных групп уже заложены у него в голове. Более того, эти предсказания он делает значительно быстрее и точнее, чем специально сконструированная компьютерная программа.

Но как этому научиться? Ответ — много практики, плюс знание нескольких закономерностей.

Для любых оценок совершенно необходимо знать инкремент метиленовой CH_2 группы, который для данной обращенной фазы также называется *метиленовой селективностью*. Инкременты метиленовой CH_2 и метильной CH_3 групп можно определить, получив хроматограмму любых трех гомологов, например, бензола, толуола и этилбензола (первые два вещества, как правило, всегда есть в лаборатории). Инкремент метильной группы, как правило, лишь немного больше инкремента метиленовой.

Допустим, мы знаем его. Что дальше? Если разделение проводится на «стандартной» C18 фазе, то все довольно просто и предсказуемо. Еще одно бензольное кольцо $-\text{C}_6\text{H}_5$ будет увеличивать удержание примерно как две метильные группы. Гидроксил $-\text{OH}$, наоборот, уменьшает удержание, нейтрализуя действие примерно трех-четырех метильных групп. Ацетильная группа $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ практически никак не изменяет величину удерживания.

Функциональные группы, способные к ионизации, уменьшают удерживание соединения, но их эффективность зависит от pH элюента. Так, кислотная карбоксильная группа $-\text{COOH}$ при низком $\text{pH} < 3$ находится в молекулярной форме. По этой причине она уменьшает удерживание умеренно, примерно как гидроксильная группа $-\text{OH}$. Например, бензойная кислота на C18 фазе при $\text{pH} 3$ имеет практически такое же удерживание, как и фенол. Но стоит сделать pH даже не щелочным, а всего лишь нейтральным, как карбоксил переходит в ионную, «солевую» форму $-\text{COO}^-$, и удерживание соединения резко уменьшается (см. разд. 2.1.4).

Все сказанное справедливо и для основных соединений с аминной функциональной группой $-\text{NH}_2$. При высоком, щелочном $\text{pH} > 11$ аминогруппа находится в молекулярной форме и умеренно уменьшает удерживание. Удерживание уменьшается сильнее при переходе к нейтральному pH , и особенно сильно при переходе к низкому pH , поскольку аминогруппа переходит в ионную, «солевую» форму $-\text{NH}_3^+$. Именно по этой причине на C18 фазах, на которых нельзя работать при щелочных $\text{pH} > 7$, основания, как правило, удерживаются достаточно слабо.

Таким образом, в обращенно-фазовой хроматографии порядок элюирования соединений можно вполне точно предсказать по их структурным формулам, что бывает очень удобно при расшифровке хроматограмм и при разработке условий разделений. Кроме того, подбор состава элюента необходимой элюирующей силы также не занимает много времени. Для этого лишь нужно иметь «в голове» несколько реперных точек: адсорбатов и соответствующих им оптимальных хроматографических систем (см. табл. 1.1).

В описанной в разд. 2.1.4 «универсальной» системе (НФ: C18 фаза, ПФ: ацетонитрил и водный буферный раствор с 1% триэтиламина, $\text{pH} 2,5$ фосфорной кислотой) можно элюировать большинство органических соединений; удерживание при этом регулируется долей ацетонитрила в элюенте. Например, для элюирования фруктовых органических кислот потребуется только водный компонент (0% ацетонитрила), для элюирования гликозидов — около 5–10% ацетонитрила, оксикоричных и бензойных кислот — 20–25%, примерно столько же, 15–40% ацетонитрила, потребуется для элюирования большинства азотистых оснований. Фенолы элюируются при 30–60% ацетонитрила, моноароматика (гомологи бензола) — при 50–60%, би- и триароматика — при 60–70%.

В ОФ режиме относительное удерживание веществ, то есть селективность $\alpha = k_1/k_2$, практически не зависит от состава подвижной фазы и природы неполярной добавки (ацетонитрил, метанол, ТГФ), а также достаточно слабо зависит от марки обращенно-фазового адсорбента. Другими словами, ОФ системы являются негибкими.

С другой стороны, в негибкости ОФ систем заключено их преимущество. ОФ разделения достаточно легко воспроизводимы, даже на обращенно-фазовых адсорбентах различных марок, не говоря уже о применении элюентов различного состава — лишь бы только элюирующая сила оставалась примерно одинаковой.

Вообще, вопрос, почему селективность ОФ систем нелегко изменить, довольно интересен. Достаточно простая модель, способная ответить на этот вопрос, впервые была изучена Хорватом.

Удерживание — это результат взаимодействия адсорбата и с неподвижной, и с подвижной фазами. Для того, чтобы селективность оставалась постоянной для достаточно представительной выборки адсорбатов, необходимо, чтобы величины взаимодействий «адсорбат-НФ» и «адсорбат-ПФ» изменялись при переходе на новую подвижную (или неподвижную) фазу пропорционально.

В ОФ системах взаимодействие «адсорбат-НФ» носит характер «неспецифического» дисперсионного взаимодействия. Можно сказать, что оно вообще не зависит от состава ПФ. При замене неподвижной фазы оно изменяется пропорционально для всех адсорбатов, если только физическая структура новой НФ аналогична физической структуре прежней.

Модель взаимодействия «адсорбат-ПФ» в обращенно-фазовых системах фактически описывает выталкивание предельно ассоциированных водой адсорбатов, обладающих определенной «гидрофобностью», из водной среды. Величина выталкивания зависит только от состава ПФ и хорошо описывается такой величиной как *свободная поверхностная энергия* (эта величина также называется *поверхностным натяжением* для границы «жидкость-воздух» и *межфазным поверхностным натяжением* для границы «жидкость-жидкость»). При переходе к элюенту другого состава величина поверхностного натяжения подвижной фазы изменяется, что приводит к пропорциональному для всех адсорбатов (заметим — предельно сольватированных водой) изменению взаимодействия «адсорбат-ПФ».

Таким образом, в обращенно-фазовых условиях селективность практически не изменяется при переходе к подвижной фазе иного состава или при переходе на новую неподвижную фазу, физическая структура которой подобна физической структуре предыдущей НФ.

ОФ системы достаточно устойчивы (robust), то есть в большинстве случаев селективность и эффективность разделения нечувствительны к колебаниям состава элюента и температуры. Исключением являются слу-

чаи разделения сильнополярных ионных соединений и гликозидов. Здесь обязательными условиями обеспечения устойчивого разделения являются термостатирование колонок и применение элюентов на основе буферных растворов, стабилизирующих pH среды (например, «универсальных» элюентов).

Наконец, очень важным преимуществом ОФ систем является их универсальность: большинство органических соединений (мономерных) можно элюировать в обращенно-фазовых условиях, особенно с применением «универсальных» элюентов.

Как следствие, даже если в обращенно-фазовых условиях разделение неоптимально, зачастую работать все же предпочитают именно в ОФ режиме. Причина заключается в том, что для перехода к нормально-фазовым условиям (и обратно) требуются некоторое время и затрата некоторых усилий. Но, честно говоря, при выполнении рутинных анализов эта процедура становится очень неудобной и часто просто недопустимой. Поэтому, при твердой необходимости проводить определения и в ОФ, и в НФ режимах лучше иметь два хроматографа — по отдельному прибору на каждый режим.

Теперь несколько комментариев по неподвижным фазам для ОФ ВЭЖХ — в дополнение к разд. 5.1.2.

Любой обращенной неподвижной фазе (так же, как и сорбату) можно приписать определенную гидрофобность. Чем выше гидрофобность НФ, тем сильнее удерживание в обращенно-фазовых условиях. Наименее гидрофобна C1 фаза, далее идет C4 фаза и цианопропильная CN фаза, далее — C8, C16, C18 фазы. Гидрофобность C8-C18 фаз уже зависит не от количества атомов углерода в привитом реагенте (то есть 8 или 18), а от *массовой доли углерода* для данной привитой силикагельной C8-C18 фазы. У самых гидрофобных C18 фаз доля углерода приближается к 20%. Большей массовой долей углерода обладают только C30 фазы.

Значительно большей гидрофобностью, чем фазы на основе силикагеля, обладают полимерные НФ на основе полистирола. Самая гидрофобная полимерная фаза — это сверхсшитый полистирол. Его высокая гидрофобность связана с высокоразвитой внутренней поверхностью ($>1000 \text{ м}^2/\text{г}$). Для него работает эмпирическое правило: чтобы получить удерживание как на C18 фазе, объемную долю неполярной добавки (например, ацетонитрила) надо увеличить вдвое (см. рис. 5.5). Большей, чем сверхсшитый полистирол, гидрофобностью обладают лишь углеродные фазы.

Некоторые обращенные фазы характеризуются необычными селективностями, которые обусловлены дополнительными вкладами одного или нескольких типов удерживания в дополнение к основному обращенно-фазовому.

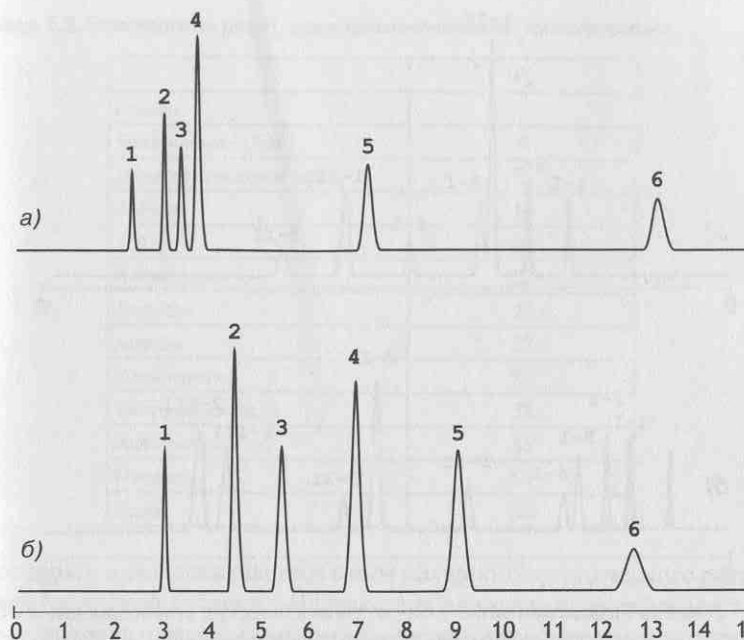


Рис. 5.5. а — неподвижная фаза: 250 × 4,6 Inertsil ODS (C18 силикагель), элюент: ацетонитрил-вода 50 : 50; б — неподвижная фаза: 250 × 4,6 Chromalite 5HGN (сверхсшитый полистирол), элюент: ацетонитрил-вода 90 : 10. 1 — ацетон, 2 — пиридин, 3 — п-хлорфенол, 4 — бензальдегид, 5 — толуол, 6 — кумол

Вклад нормально-фазового типа наиболее ярко проявляется на фазах: неэндкэппированных, с полярным эндкэппингом и с полярным привитым реагентом (polar-embedded group). Он достаточно велик для гидрофильных соединений, например, любых гликозидов. Для подобных адсорбатов увеличение доли неполярной добавки в элюенте может привести, фактически, к изменению обращенно-фазового типа удерживания на смешанный и далее, в пределе, на нормально-фазовый (гидрофильная хроматография). Вообще говоря, применять такие фазы для рутинного анализа нежелательно — полученные разделения, пусть даже хорошие, бывает очень трудно воспроизвести.

Вклад удерживания с переносом заряда проявляется на неподвижных фазах, содержащих ароматические π -донорные/акцепторные фрагменты: пентафторфенильных (C_6F_5) и пиренильных (PYE) НФ на основе силикагеля, полистирольных средней степени сшивки и в особенности на поли-

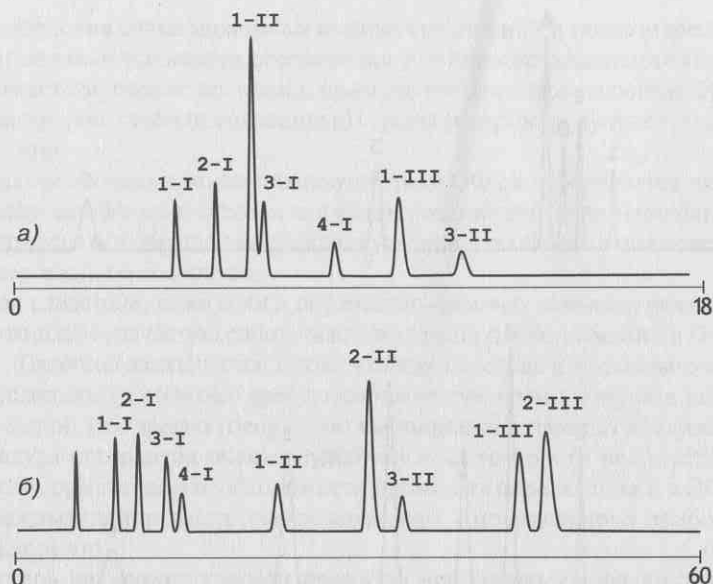


Рис. 5.6. Разделения моно-, би- и трициклических углеводородов на C18 силикагеле (а) и сверхсшитом полистироле (б). 1-I – бензол, 2-I – толуол, 3-I – о-ксилол, 4-I – кумол, 1-II – нафталин, 2-II – флуорен, 3-II – 2,7-диметилнафталин, 1-III – фенантрен, 2-III – антрацен

стирольных сверхсшитых и углеродных НФ. В качестве иллюстрации на рис. 5.6 приведен пример разделения моно-, би- и трициклических углеводородов на C18 силикагеле и сверхсшитом полистироле. На полистирольном адсорбенте группы элюируются последовательно, строго друг за другом – в отличие от C18 силикагеля, на котором они перекрываются.

5.3. Нормально-фазовая хроматография (НФ ВЭЖХ) и ее основные закономерности. «Диполь-полевая» модель удерживания в НФ ВЭЖХ. Неподвижные фазы для НФ ВЭЖХ

Типичная нормально-фазовая хроматографическая система состоит из полярной неподвижной фазы (НФ) и неполярной подвижной фазы (ПФ).

В качестве ПФ в нормально-фазовой хроматографии применяются системы, состоящие из алифатического углеводорода, например, гекса-

Таблица 5.3. Элюотропный ряд P_N для нормально-фазовой хроматографии

	P_N
Гексан	1
Триэтиламин (ТЭА)	6
Диизопропиловый эфир	9
Бензол	13
ТГФ	21
Хлороформ	22
Диоксан	22
Ацетон	32
2-пропанол	37
Уксусная кислота	38
Ацетонитрил	45
Метанол	54
Вода	100

на (основы), и смешивающегося с ним полярного органического растворителя (полярной добавки). Нередко в подвижную фазу добавляют небольшую долю третьего компонента, растворителя высокой полярности, который называется модификатором (см. разд. 2.2.1). Элюирующая сила ПФ возрастает с увеличением доли полярного органического растворителя.

Весьма удачный элюотропный ряд P_N для НФ ВЭЖХ был разработан О.Б. Рудаковым (см. табл. 5.3). Однако, надо хорошо понимать, что даже этот ряд отражает реальную элюирующую силу растворителя в каждом конкретном разделении лишь очень приблизительно.

На это есть две основные причины. Но чтобы их понять, нам сначала придется познакомиться с избранными теоретическими выкладками.

Основной наиболее удачной «диполь-полевой» теории нормально-фазовой хроматографии является простая модель, предложенная С.Н. Сычевым. В этой модели адсорбент считается уже адсорбционно модифицированным. Поверхность, «закрытая» слоем молекул модификатора, рассматривается как пластина заряженного конденсатора. Электрическое поле является суммой нескомпенсированного заряда «немодифицированного» адсорбента и дипольных моментов молекул модификатора. Энергия адсорбции молекулы с дипольным моментом μ равна потенциальной энергии взаимодействия диполя с полем адсорбента напряженности E :

$$E_{\text{адс.}} = -\mu \times E.$$

Напряженность электрического поля полярной адсорбционно модифицированной неподвижной фазы составляет величину порядка 10^9 В/м, а энергия «диполь-полевого» взаимодействия — порядка кДж/моль. Данная модель отлично описывает адсорбционное поведение соединений умеренной полярности, которые не способны вытеснить с поверхности молекулы модификатора и «встраиваться» в адсорбционный слой. Для таких соединений удерживание однозначно определяется дипольным моментом их сольватного комплекса с молекулами полярной добавки. Удерживание, аппроксимированное к нулевой объемной доле полярной добавки, отлично коррелирует с дипольными моментами соединений, определенными стандартными, хроматографическими методами.

Теперь вернемся к двум причинам, по которым для нормально-фазового режима нельзя составить единственного «правильного» элюотропного ряда растворителей.

Первая причина. Вид элюотропного ряда будет сильно зависеть от наличия или отсутствия добавки модификатора в подвижной фазе. Ряд P_N соответствует ситуации уже адсорбционно-модифицированного адсорбента. Эта ситуация, как правило, как раз и встречается на практике. Но в течение долгого времени хроматографисты пользовались другим рядом $\epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$, предложенным Снайдером (см. табл. 5.4).

Таблица 5.4. Элюотропный ряд $\epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$ для нормально-фазовой хроматографии

	$\epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$	P_N
Гексан	0,01	1
Бензол	0,25	13
Хлороформ	0,26	22
Диизопропиловый эфир	0,28	9
Триэтиламин (ТЭА)	0,42	6
ТГФ	0,44	21
Ацетон	0,5	32
2-пропанол	0,55	37
Диоксан	0,6	22
Ацетонитрил	0,6	45
Метанол	0,7	54
Уксусная кислота	> 1	38
Вода	1,5	100

$\epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$ определяется как энергия адсорбции растворителя, отнесенная к площади адсорбента, занятой растворителем. Модель Снайдера описывает вытеснение адсорбатов полярной добавки с поверхности немодифицированного полярного адсорбента. На практике, надо сказать, такие случаи встречаются редко.

При сравнении рядов P_N и $\epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$ выясняется любопытный факт: «элюирующая сила» триэтиламина и уксусной кислоты по $\epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$ получается значительно выше, чем по P_N . Эти вещества по своему действию являются выраженными модификаторами, то есть хорошо связываются с полярным адсорбентом, в то время как при адсорбционно модифицированной поверхности их элюирующая сила умеренна. Таким образом, $\epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$ является, скорее, не элюотропным рядом, а рядом модифицирующей способности веществ.

Вторая причина. Допустим, что в условиях адсорбционного модифицирования удерживание определяется исключительно дипольным моментом сольватного комплекса адсорбата с полярной добавкой. По сути, это утверждение означает, что элюирующая сила растворителя обусловлена ни чем иным, как его способностью к сольватированию адсорбата. Уже на этом этапе становится понятно, что, поскольку адсорбатами могут являться различные соединения, которые могут по-разному сольватироваться одним и тем же растворителем, элюирующая сила растворителя неизбежно будет зависеть от химической природы адсорбата.

Например, для адсорбата фенола повышенной относительно P_N элюирующей силой будут обладать спирты, поскольку фенол хорошо ассоциируется со спиртами за счет сильных водородных связей. Для адсорбата бензойной кислоты повышенной элюирующей силой будет обладать уксусная кислота, поскольку карбоновые кислоты образуют прочные димеры (сольватные комплексы 1 : 1).

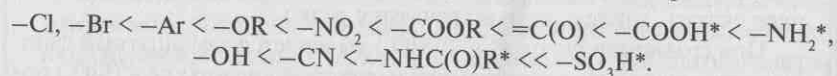
Поэтому ряд P_N , прежде всего, хорош как некоторый средневзвешенный по всем возможным адсорбатам, наиболее универсальный критерий элюирующей силы для НФ систем.

Для оценки удерживания соединений в нормально-фазовых условиях применяется понятие полярности. Чем полярнее соединение, тем сильнее оно удерживается в НФ системах, поскольку сильнее взаимодействует с полярным адсорбентом, чем с неполярным элюентом.

Если гидрофобности еще можно приписать какое-либо численное значение, то полярность — это целиком и полностью качественная характеристика. Полярность как мера удерживания в НФ системах не подчиняется никаким аддитивным схемам; фактически, приписать функциональным группам определенный численный инкремент невозможно. Именно по-

этому предсказать адсорбционное поведение адсорбата в нормально-фазовых условиях по его структурной формуле очень сложно.

Все же, в грубом приближении, функциональные группы можно расположить в следующий ряд в порядке увеличения их полярности:



Звездочкой отмечены те функциональные группы, которые способны образовывать сильные водородные связи. Если такая группа является единственной полярной группой в соединении, то ее полярность в целом соответствует ее положению в приведенном ряду. Например, удерживание на силикагеле при применении элюента «гексан-уксусная кислота» возрастает в ряду бензол < нитробензол ($-\text{NO}_2$) < бензойная кислота ($-\text{COOH}^*$) < фенол ($-\text{OH}$).

Но наличие второй, также достаточно полярной, группы в дополнение к первой «со звездочкой» приведет к очень резкому, нелинейному росту полярности. Все будет зависеть еще и от положения функциональных групп. Так, гидроксibenзойные и аминокислоты, где группы $-\text{COOH}^*$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2^*$ являются заместителями в бензольном кольце, в принципе, еще можно элюировать в нормально-фазовых условиях, применяя элюенты с высокой долей полярной добавки. Но ни миндальную кислоту, ни фенилаланин, где $-\text{COOH}^*$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2^*$ группы находятся в алифатической цепи, в «классических» нормально-фазовых условиях элюировать не получится — они слишком полярны. Эти соединения даже не растворятся в неполярном элюенте. Для их разделения необходимы условия гидрофильной хроматографии с водноорганическими элюентами (см. далее).

Таким образом, в условиях «классической» нормально-фазовой хроматографии определяют только соединения умеренной полярности, что значительно ограничивает универсальность метода.

В разд. 5.2 было сказано, что в обращенно-фазовой хроматографии селективность разделения достаточно сложно изменить. В зависимости от ситуации это можно рассматривать и как преимущество, и как недостаток метода. Подобная дилемма существует и для нормально-фазовой хроматографии — с тем лишь исключением, что селективность разделения, напротив, изменяется здесь довольно легко. Другими словами, НФ системы являются *гибкими* (flexible).

Положительный момент состоит в том, что селективностью можно управлять, целенаправленно изменяя состав подвижной фазы или тип неподвижной фазы, тем самым добиваясь оптимального разделения. Негативный момент заключается в том, что освоить эту науку (и где-то даже искусство) не очень-то просто.

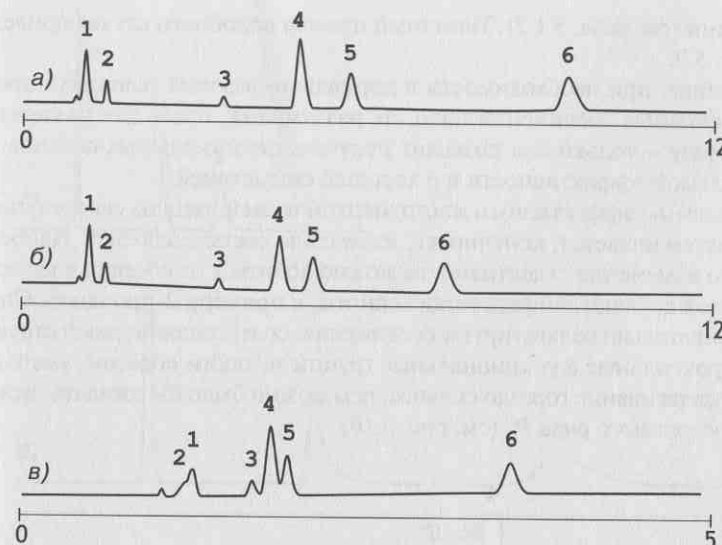


Рис. 5.7. Разделение тестовой смеси. Колонки 150 × 3, адсорбенты, 5 мкм: (а) Separon SGX (силикагель); (б) Separon NH₂ (аминофаза); (в) Separon CN (нитрильная фаза). Элюент: гексан-изопропанол-уксусная кислота 95 : 2 : 3. 1 — примесь, 2 — примесь, 3 — примесь, 4 — бензойная кислота, 5 — метилфенилуксусная кислота, 6 — фенол

Рассмотрим наиболее действенные «рецепты» для резкого и плавного изменения селективности. Начнем с неподвижных фаз. Наиболее распространены три типа адсорбентов для НФ ВЭЖХ: силикагель, аминопропилированный силикагель (аминофаза, NH₂) и цианопропилированный силикагель (нитрильная фаза, цианофаза, CN). Силикагель и аминофаза близки по своим свойствам; нитрильная фаза достаточно сильно от них отличается (см. рис. 5.7).

Этим можно пользоваться, если на силикагеле достичь приемлемого разделения не удается — силикагель можно попытаться заменить нитрильной фазой. Нередко такое решение приводит к успеху, особенно в тех случаях, когда адсорбаты являются соединениями нейтральными, однако с достаточно высокими дипольными моментами (см. рис. 5.8).

Впрочем, селективность для силикагеля и аминофазы также может быть различной. Эти случаи наблюдаются для основных, азотсодержащих адсорбатов. В их отношении силикагель обладает аномально высоким удерживанием, видимо, не в последнюю очередь за счет нежелательных взаимодействий с примесями металлов и «активными» силанольными

группами (см. разд. 5.1.2). Типичный пример подобного случая приведен на рис. 5.9.

Вообще, при необходимости в нормально-фазовых условиях определять основные соединения надо, не раздумывая, брать для разделения аминофазу — только она позволит получать пики основных соединений приемлемой эффективности и с хорошей симметрией.

Но самым эффективным инструментом воздействия на селективность НФ систем является, конечно же, изменение состава элюента. Наиболее резкого изменения селективности можно добиться, применяя в качестве полярной добавки алифатические спирты, к примеру, 2-пропанол. Спирты избирательно сольватируют соединения, содержащие в своей структуре гидроксильные функциональные группы и, таким образом, уменьшают их удерживание гораздо сильнее, чем можно было бы ожидать, исходя из элюотропного ряда P_N (см. рис. 5.10).

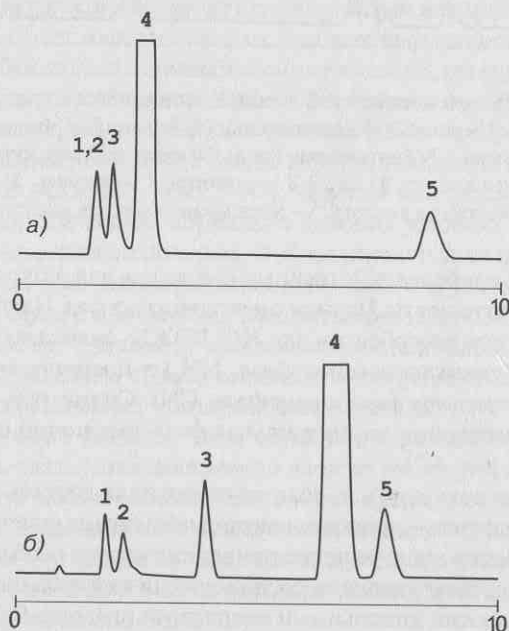


Рис. 5.8. Разделение бенздиазепина (структурная формула соединения неизвестна) от сопутствующих примесей: (а) 80 × 2 Separon SGX (силикагель); (б) 80 × 2 Separon CN (нитрильная фаза). Элюент: гексан-хлороформ-изопропанол 76 : 20 : 4. 1, 2, 3, 5 — примеси, 4 — бенздиазепин

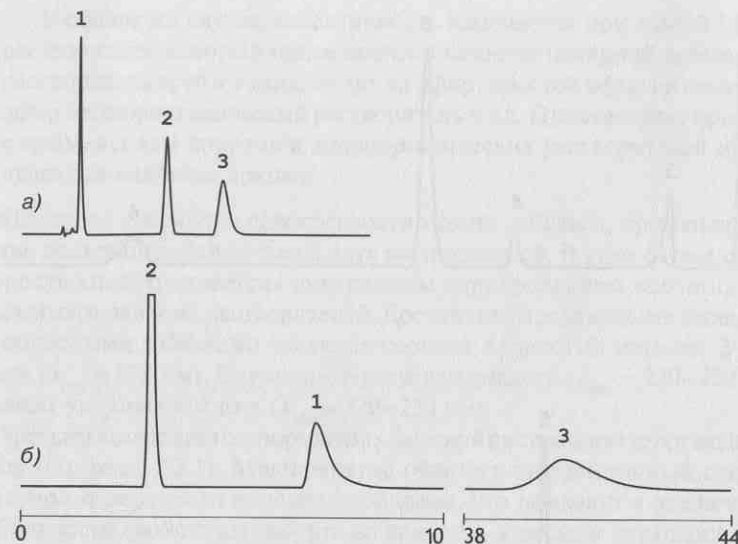


Рис. 5.9. Разделение тестовой смеси. Неподвижные фазы: (а) 150 × 3 Separon NH_2 (аминофаза), (б) 150 × 3 Separon SGX (силикагель). Элюент: гексан-изопропанол-ТЭА-уксусная кислота 90 : 10 : 0,1 : 0,1. 1 — никотин, 2 — фенол, 3 — хинин

Особенно очевидной эта закономерность становится для пары фенол/бензойная кислота. Для нее селективность изменяется примерно от 2,5 на элюенте гексан-изопропанол-уксусная кислота 95 : 2 : 3 (k' бензойной кислоты = 3,7, k' фенола = 9,3) до 0,07 (k' фенола = 1, k' бензойной кислоты = 14) на элюенте гексан-изопропанол-ТЭА-уксусная кислота 80 : 20 : 0,1 : 0,1. Уксусная кислота избирательно уменьшает удерживание бензойной кислоты, а изопропанол — фенола; в сумме оба эффекта и приводят к тому, что селективность пары можно изменить на два порядка.

В том случае, когда адсорбатами являются ароматические соединения, селективность системы можно сильно изменить, применяя в качестве полярной добавки хлороорганические растворители: хлористый метилен, хлороформ, которые способны к π -взаимодействиям с ароматическими адсорбатами.

Оба эмпирических правила, «спиртов» и «хлороорганики», отлично выполняются в хиральной нормально-фазовой хроматографии (см. Приложение Б). Более того, именно там без этих правил не обойтись, поскольку селективность разделения пары энантиомеров, как правило, критически зависит от природы полярной добавки.

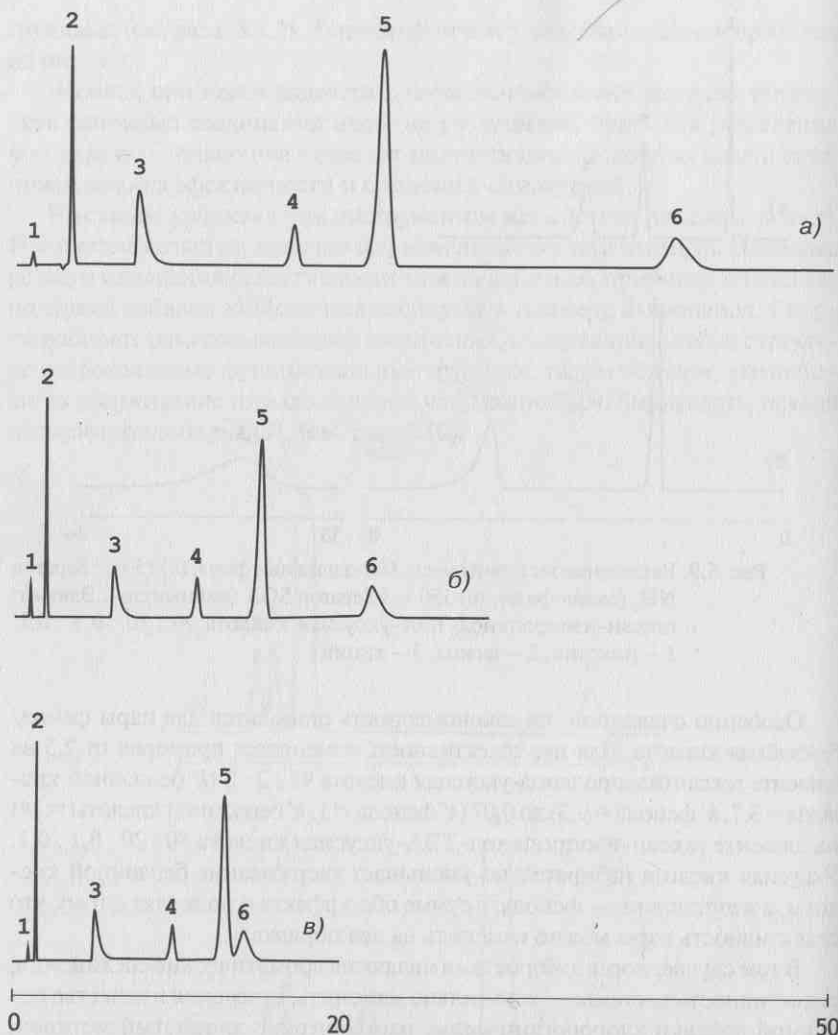


Рис. 5.10. Резкое уменьшение удерживания гидроксил-содержащих соединений при увеличении доли спирта в неполярном элюенте (см. пары 1/2 и 5/6). Неподвижная фаза: 150 × 3 Seraport SGX, 5 мкм. Элюент: гексан-изопропанол-ТЭА-уксусная кислота, (а) 10%, (б) 20% и (в) 30% изопропанола в элюенте. 1 — нулевое время, 2 — фенол, 3 — никотин, 4 — фенилпропионовая кислота, 5 — бензойная кислота, 6 — хинин

В общем же случае, селективность изменяется при любой замене растворителя, который применяется в качестве полярной добавки, на растворитель другого типа: спирт на эфир, простой эфир на сложный, эфир на хлорорганический растворитель и т.д. Приведенные примеры с применением спиртов и хлороорганических растворителей просто являются наиболее яркими.

Плавного изменения селективности можно добиться, применяя в качестве полярной добавки смеси двух растворителей. В этом случае селективность «подстраивается» аккуратным варьированием соотношения объемных долей этих растворителей. Достаточно популярными бинарными полярными добавками являются составы: хлористый метилен-2-пропанол ($\lambda_{\min} \approx 235$ нм), 2-пропанол-уксусная кислота ($\lambda_{\min} \approx 220-230$ нм), диоксан-уксусная кислота ($\lambda_{\min} \approx 220-230$ нм).

Третьим компонентом нормально-фазовой системы является модификатор (см. разд. 2.2.1). Модификатор образует адсорбционный слой на полярной поверхности неподвижной фазы, что приводит к увеличению стабильности свойств адсорбента во времени, а также к улучшению эффективности и симметрии пиков кислотных и основных соединений. Доля модификатора в подвижной фазе обычно невелика: от сотых процента до нескольких процентов; в последнем случае полярный растворитель (например, уксусная кислота) может одновременно играть роль и полярной добавки, и модификатора.

В качестве модификатора чаще всего применяется уксусная кислота. Ее применение обязательно при разделении соединений кислого характера. При разделении основных соединений в качестве модификатора применяют алифатические амины, например, триэтиламин (ТЭА).

Следует помнить, что при достаточно высокой концентрации уксусной кислоты или ТЭА в элюенте (десятые доли процента и выше) реализуется режим ион-парной нормально-фазовой хроматографии. Например, при добавлении в элюент ТЭА значительно возрастают удерживание и селективность разделения кислотных соединений. Чтобы не переходить в этот режим, в качестве модификатора надо применять смесь кислоты и амина (комплексный модификатор, см. далее).

Если среди адсорбатов есть нейтральные соединения достаточно высокой полярности, то в качестве модификатора могут применять воду. В этом случае элюент обязательно должен содержать 5–10% алифатического спирта, чаще изопропанола, чтобы вода растворилась в неполярной среде.

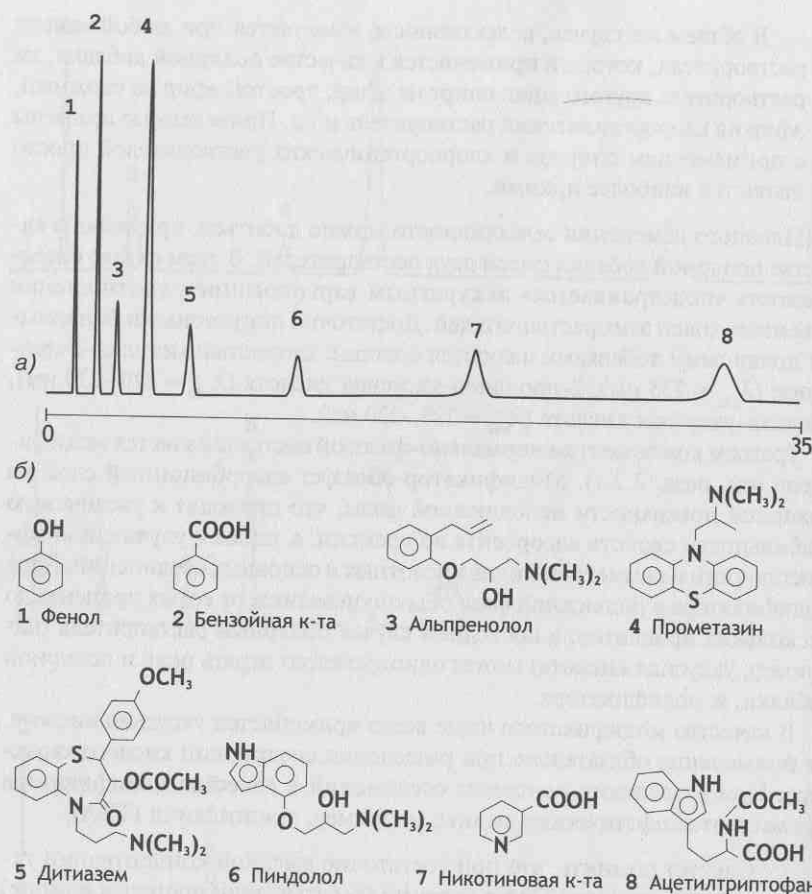


Рис. 5.11. Разделение ряда полярных соединений в нормально-фазовом режиме. Неподвижная фаза: 150 × 3 Separon SGX (силикагель), 5 мкм. Элюент: гексан-изопропанол-ТЭА-уксусная кислота 60 : 40 : 0,2 : 0,75

Если разделяемая смесь содержит и кислоты, и основания, то применять следует комплексный модификатор — смесь уксусной кислоты и триэтиламина. Опыт показывает, что:

- кислоты надо брать больше амина, например, в объемном отношении 3 : 1,
- объемная доля комплексного модификатора не должна быть большой, желательно, не более процента,

— нельзя применять комплексный модификатор с водой, то есть использовать состав уксусная кислота-ТЭА-вода — это может привести к выпадению органической соли в осадок и закупориванию колонки.

В системах с комплексным модификатором можно разделять достаточно полярные соединения (см. рис. 5.11). Естественным ограничением, правда, является очень небольшая растворимость полярных соединений в неполярном элюенте.

5.4. Гидрофильная хроматография (HILIC). ДИРФ режим

Гидрофильная хроматография (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC), по сути, является нормально-фазовой хроматографией для разделения очень полярных, водорастворимых соединений: сахаров и гликозидов, органических кислот и аминокислот, полипептидов, бетаинов (см. рис. 5.12), различных фармацевтических препаратов. Русскоязычный термин «гидрофильная хроматография» предложен автором, поскольку официального аналогичного термина не существует.

От «классической» НФ ВЭЖХ гидрофильная хроматография отличается, прежде всего, составом элюента. Основой элюента здесь является ацетонитрил, полярной добавкой — вода или водный буферный раствор. Вода одновременно является модификатором, поскольку образует на полярном адсорбенте полимолекулярный адсорбционный слой.

В качестве неподвижной фазы, как правило, применяют аминофазу, реже силикагель и иные полярные (цвиттер-ионные, амидные) фазы. Удержание в гидрофильной хроматографии уменьшается при увеличении доли полярной добавки — воды.

Если адсорбатами являются ионогенные вещества, то удержание также зависит от pH водной части элюента — оно увеличивается при его изменении в сторону увеличения ионизации адсорбатов (см. табл. 5.5).

Таблица 5.5. Зависимость коэффициента удерживания бетаинов от pH.
Элюент: 70% ацетонитрила в 0,02 М водном фосфатном буфере

Соединение	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
Глицинбетаин	0,95	2,15	3,16	3,23	3,50	3,71	3,99
β-аланин-бетаин	2,17	4,31	6,21	6,33	6,96	7,85	8,15
γ-треонина-бетаин	2,02	3,98	5,82	5,95	6,12	7,01	7,08
Бетаин γ-аминомасляной кислоты	3,85	5,35	8,51	9,06	9,23	9,82	10,2

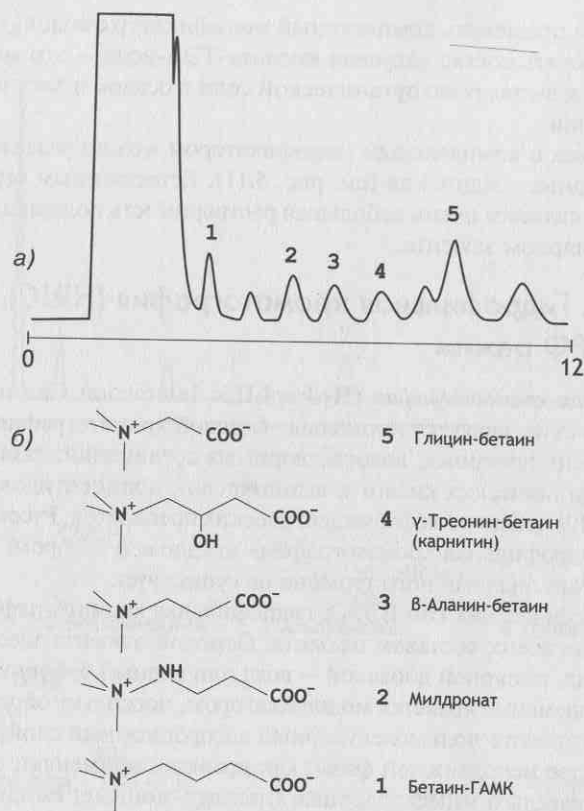


Рис. 5.12. Разделение ряда бетаинов в плазме крови на силикагеле, химически модифицированном альбумином. Элюент: 72% ацетонитрила в 0,26 М водном фосфатном буфере, pH 6,3. Адсорбент приготовлен А. Серданом, разделение выполнено Л. Сапрыкиным

Однако, если разделение проводится на аминофазе или любой другой фазе с ионными функциональными группами, значительный вклад в удерживание может уже давать ионный обмен. В результате, для подобного «гидрофильно-ионообменного» (HILIC/ion-exchange) режима можно наблюдать достаточно сложные зависимости удерживания ионогенных адсорбатов от pH.

Известны случаи, когда для достижения лучшего разделения вклад ионообменного типа удерживания увеличивался сознательно, например, добавлением в подвижную фазу ион-парного реагента (см. рис. 5.12).

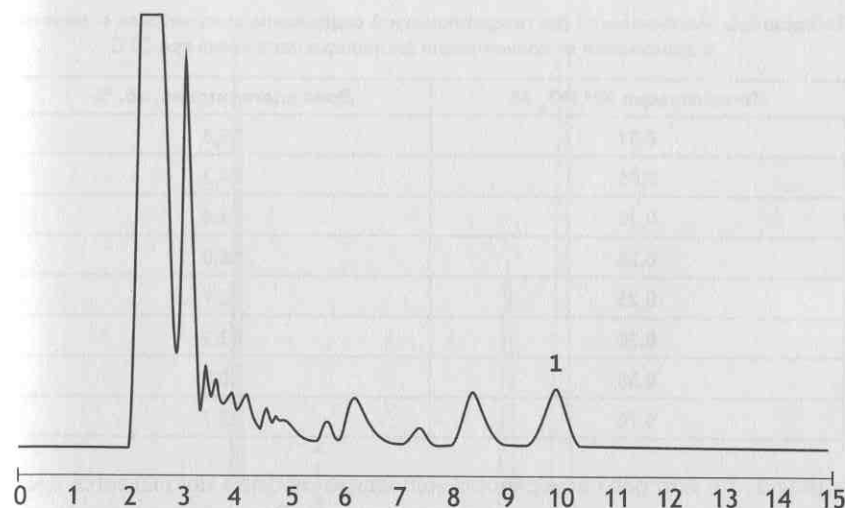


Рис. 5.13. Хроматограмма спиртового раствора экстракта из желчи наркомана. Неподвижная фаза: 120 × 2 Диасорб-130-Амин, 5 мкм. Элюент: ацетонитрил-0,005 М водный раствор тетрабутиламмоний фосфата (85 : 15). 1 – морфин. Разделение выполнено А. Удаловым

При увеличении концентрации неорганической соли в водной части элюента (как правило, дигидрофосфата калия) гидрофильный режим приобретает некоторые новые отличительные черты. В связи с этим Л.В. Сапрыкин, долгое время исследовавший подобные хроматографические системы, назвал данный вариант гидрофильной хроматографии *ДИРФ режимом*, то есть режимом динамически индуцированного раздела фаз. В международной литературе этот режим хорошо известен под названием *жидкость-жидкостной хроматографии (ЖЖХ)*.

Существует некоторая критическая концентрация соли в водной фазе, выше которой водная фаза перестает смешиваться с ацетонитрилом. Чем выше доля ацетонитрила в смеси, тем меньшей концентрации соли достаточно для ее расслоения обратно на две фазы: водно-солевой раствор и ацетонитрил. Для дигидрофосфата калия зависимость критической концентрации соли от доли ацетонитрила приведена в табл. 5.6.

Допустим, мы приготовили смесь ацетонитрила с водным раствором соли концентрации немного ниже критической, например, с 80% ацетонитрила и 20% водного 0,05 М раствора $\text{KН}_2\text{РO}_4$. Эта смесь гомогенна, но при контакте с полярным адсорбентом происходит микрорасслаивание,

Таблица 5.6. Максимальное (до гетерогенизации) содержание ацетонитрила в элюенте в зависимости от концентрации дигидрофосфата калия при 20°C

Концентрация KH_2PO_4 , М	Доля ацетонитрила, об. %
0,01	95,8
0,05	84,3
0,10	75,4
0,20	66,0
0,25	58,7
0,30	53,1
0,50	40,0
0,70	35,7

в результате которого поверхность неподвижной фазы покрывается достаточно толстым слоем водной части элюента. Этот процесс и называется динамически индуцированным разделом фаз.

Основная отличительная черта режима — очень высокая емкость неподвижной фазы, что позволяет применять ДИРФ хроматографию, к примеру, для препаративного выделения пептидов и белков. На рис. 5.14 приведена хроматограмма пчелиного яда, содержащего высокомолекулярные пептиды с молекулярной массой от 2000 до 30 000. Это разделение, перенесенное в полупрепаративный вариант, способно обеспечивать загрузку $150 \times 9,4$ колонки на уровне 3,5 г!

Также обращает на себя внимание применение автором градиентного элюирования, что для жидкость-жидкостных хроматографических систем, вообще говоря, ранее не считалось типичной техникой. Разделение в градиенте позволяет отчасти компенсировать низкую эффективность этого хроматографического режима.

Еще одной особенностью ДИРФ режима является очень высокая чувствительность величины удерживания к изменению концентрации ацетонитрила в элюенте. Факторы удерживания отдельных соединений могут изменяться в несколько раз при изменении концентрации ацетонитрила всего на несколько процентов. Это происходит тогда, когда система переходит из гетерогенного в гомогенный режим или наоборот. Этот переход сильно зависит от температуры, и поэтому в работе в ДИРФ режиме требуется тщательный температурный контроль. В некоторых случаях все это может создавать определенные технические проблемы, правда, вполне преодолимые при аккуратной работе.

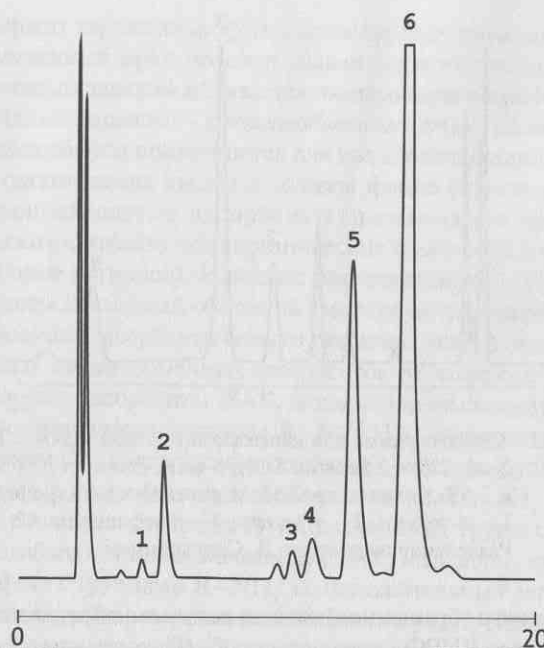


Рис. 5.14. Хроматограмма пчелиного яда в режиме ДИРФ. Неподвижная фаза: 80×2 Separon SGX, 5 мкм. Градиентное элюирование: 20–50% ацетонитрила в 0,37 М водном растворе дигидрофосфата калия. 1 — гиалуронидаза, 2 — апамин, 3 — адолапин, 4 — пептид 410, 5 — фосфолипаза A2, 6 — мелиттин. Разделение выполнено Л. Сапрыкиным

Следует особо подчеркнуть, что спирты не могут применяться в качестве основы элюентов в ДИРФ режиме, поскольку ведут себя в солевых растворах совершенно иначе, чем ацетонитрил. При смешивании концентрированного водного раствора соли с метанолом избыточная соль выпадает в осадок, и остается лишь одна жидкая метанольно-водно-солевая фаза. Тем не менее, добавка метанола в элюент на уровне 3–7% от доли ацетонитрила позволяет заметно повысить эффективность разделения и несколько «смягчить» слишком сильную зависимость удерживания адсорбатов от концентрации ацетонитрила. Глицерин и этиленгликоль ведут себя подобно метанолу.

На рис. 5.15 приведен пример применения элюента с добавкой метанола для ДИРФ разделения компонентов змеиного яда (молекулярная масса некоторых разделенных компонентов превышает 50 000).

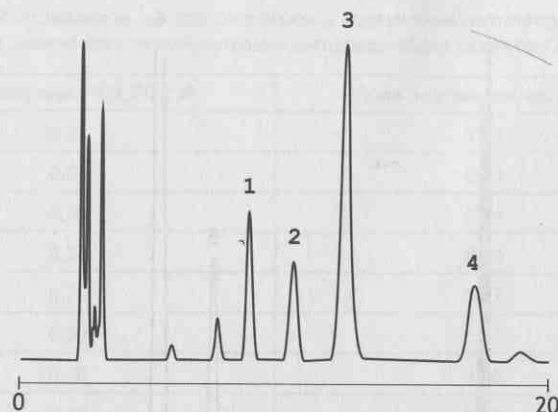


Рис. 5.15. Хроматограмма яда кавказской степной гадюки. Неподвижная фаза: 120 × 2 Separon SGX, 5 мкм. Элюент: 32% ацетонитрила и 2,5% метанола в 0,35 М растворе дигидрофосфата калия. 1 — α -токсин, 2 — γ -токсин, 3 — фосфолипаза A2, 4 — β -токсин. Разделение выполнено Л. Сапрыкиным

По сравнению с обращенно-фазовым режимом, определение полярных веществ в режиме ДИРФ становится особенно выгодным, если матрица образца содержит много липофильных веществ. В режиме ДИРФ они практически не удерживаются и выходят «в нулевом объеме». Таким образом, применение ДИРФ позволяет снизить требования к очистке образца и, соответственно, сократить затраты времени и средств на подготовку пробы.

Компания YMC одной из первых разработала методику определения меламина в молочной продукции на неподвижной фазе YMC-Pack Diol-NP в режиме гидрофильной хроматографии (HILIC). Преимущество метода состоит в том, что основные неполярные соединения матрицы образца, в том числе жиры, не удерживаются в HILIC режиме и не загрязняют хроматографическую колонку.

Подробности на сайте эксклюзивного представителя YMC ООО «Физлабприбор» www.fizlabpribor.ru¹.

5.5. Ионная хроматография

Анализ ионных соединений может быть выполнен при помощи ионной хроматографии (ion chromatography, IC). Адсорбент для ионной хроматографии

¹ На правах рекламы.

рафии содержит заряженные функциональные группы; его поверхность имеет определенный заряд, положительный или отрицательный. Адсорбент с положительным зарядом называется *анионообменным* (anion-exchange), а с отрицательным зарядом — *катионообменным* (cation-exchange). Анионообменные адсорбенты применяются для разделения неорганических анионов либо органических кислот в солевой форме (то есть в форме анионов). Катионообменные адсорбенты применяются для разделения неорганических катионов либо органических оснований в солевой форме (то есть в форме катионов). Наиболее распространены в ИС ионообменные адсорбенты невысокой обменной емкости на полимерной основе.

Ионообменные адсорбенты бывают слабыми (weak) и сильными (strong). Заряд сильных анионообменных адсорбентов не зависит от pH. Сильные анионообменные адсорбенты (SAX, strong anion-exchange) содержат триметиламмонийпропильные группы $R-N^+(CH_3)_3$, сильные катионообменные адсорбенты (SCX, strong cation-exchange) — сульфогруппы $R-SO_3^-$.

Заряд слабых ионообменных сорбентов зависит от pH, поскольку pH определяет степень ионизации функциональных групп сорбента. Так, типичным слабым анионообменником (WAX, weak anion-exchange) является аминокислота с группами $R-NH_2$; ее положительный заряд возрастает при уменьшении pH по мере ионизации аминогрупп. Типичными слабыми катионообменниками (WCX, weak cation-exchange) являются различные адсорбенты с карбоксильными группами $R-COOH$; их отрицательный заряд возрастает при увеличении pH.

Заряд доступной поверхности ионообменного адсорбента определяет не только величину удерживания ионов противоположного знака, но и эффективную *обменную емкость* адсорбента. Таким образом, поскольку заряд поверхности слабых ионообменных материалов зависит от pH, от него оказывается зависимой и емкость этих адсорбентов.

В качестве элюентов для ионной хроматографии применяются водные буферные растворы, содержащие *вытесняющий ион* (driving ion). Вытесняющий ион заряжен одноименно с разделяемыми ионами; он вытесняет их с противоположно заряженной поверхности. Термин «ионный обмен» как раз подчеркивает тот факт, что величина удерживания является результатом конкуренции между разделяемыми ионами и вытесняющим ионом, которые заменяют друг друга в координационной сфере заряженной функциональной группы ионообменного адсорбента.

Ионная хроматография является оптимальным методом определения неорганических анионов (см. рис. 5.16). В качестве вытесняющих ионов в этом анализе применяются гидрокарбонат-ион (элюентом является вод-

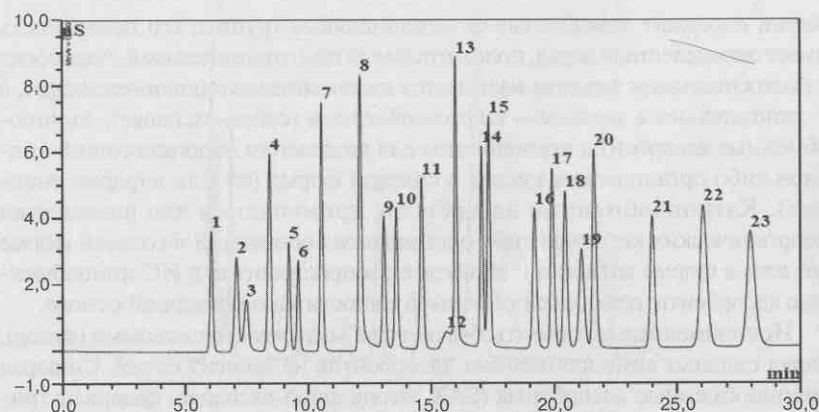


Рис. 5.16. Разделение неорганических и органических анионов. Неподвижная фаза: IonPac AS20. Градиентное элюирование: от 5 мМ до 55 мМ водного гидроксида калия. 1 – фторид, 2 – ацетат, 3 – бутират, 4 – формат, 5 – хлорит, 6 – бромат, 7 – хлорид, 8 – нитрит, 9 – хлорат, 10 – бромид, 11 – нитрат, 12 – карбонат, 13 – сульфат, 14 – селенат, 15 – оксалат, 16 – фталат, 17 – фосфат, 18 – хромат, 19 – иодид, 20 – арсенат, 21 – цитрат, 22 – тиоцианат, 23 – перхлорат. www.dionex.com

ный раствор $\text{NaHCO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$) или гидроксид-ион (элюентом является водный раствор KOH).

Можно выделить два основных практических способа изменения селективности ионообменных систем. Во-первых, селективностью можно управлять, варьируя pH, если разделяемые соединения (как правило, органические) содержат ионогенные функциональные группы, степень ионизации которых зависит от pH.

Во-вторых, селективность разделения любых, органических и неорганических, ионов можно в определенных пределах изменить, добавляя в подвижную фазу различные органические растворители, смешивающиеся с водой.

Это явление объясняется тем, что эффективные радиусы разделяемых ионов, учитывающие также их сольватную оболочку, при внесении доли второго растворителя неизбежно изменяются, причем для разных ионов в различной степени. Напомним, что именно от величины эффективного радиуса иона зависит его поверхностная плотность заряда и, в итоге, величина удерживания в ионообменных системах (см. Приложение А, разд. А.2.4).

Большинство новых типов фаз для ионной хроматографии сконструированы на полимерной основе. Основным путем развития этого направления остается увеличение эффективности полимерных ионообменных фаз.

При разделении ионизированных органических соединений на полимерных ионообменных фазах значительный вклад в удерживание, как правило, вносит обращенно-фазовый механизм, то есть реализуется смешанный «ионообменно-обращенно-фазовый» (RP/ion-exchange) режим. Это, в свою очередь, означает то, что подвижная фаза должна содержать некоторую долю неполярной добавки, например, ацетонитрила. В этих случаях очень важным свойством полимерного ионообменного адсорбента является совместимость с органическими растворителями, которым в достаточной мере обладают лишь полимерные материалы с высокой, не менее 50%, степенью сшивки. Неподвижные фазы, работающие в «ионообменно-обращенно-фазовом» режиме, разработаны и на основе силикагеля.

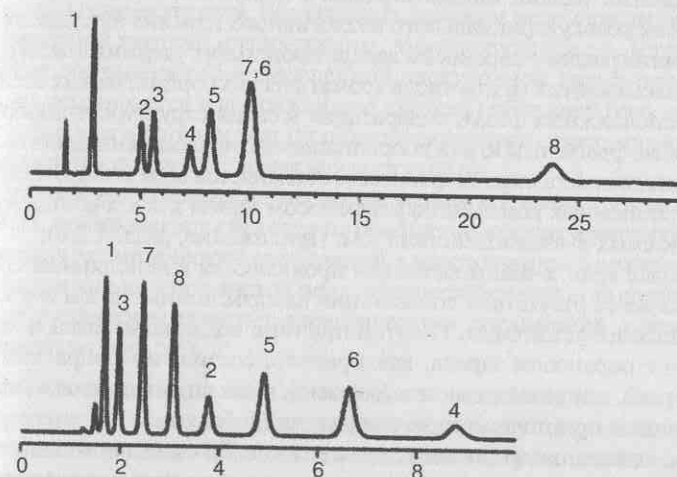


Рис. 5.17. Разделение тестовой смеси в «ионообменно-обращенно-фазовом» режиме. Неподвижная фаза: $150 \times 4,6$ Primesep 100. Элюент: (вверху) вода-ацетонитрил-трифторуксусная кислота 70 : 30 : 0,2 – больший вклад обращенно-фазового режима, (внизу) вода-ацетонитрил-трифторуксусная кислота 30 : 70 : 0,15 – больший вклад катионообменного режима. 1 – миндальная кислота, 2 – тирозин, 3 – бензойная кислота, 4 – пиридин, 5 – фенилаланин, 6 – бензиламин, 7 – бензонитрил, 8 – толуол. www.primesep.com

Фактически, применение подобных неподвижных фаз делает ион-парную обращенно-фазовую хроматографию ненужной техникой, поскольку необходимый смешанный механизм разделения достигается без введения ион-парных добавок в подвижную фазу. Селективность хроматографических систем в «ионообменно-обращенно-фазовом» режиме зависит от многих факторов, в том числе от соотношения долей водной части элюента и органического растворителя. Если подвижная фаза содержит лишь небольшую добавку органического растворителя, то механизм разделения в основном является ионообменным. При значительной доле органического растворителя в элюенте порядок элюирования ионогенных органических соединений в основном соответствует обращенно-фазовому типу (см. рис. 5.17).

5.6. Хроматография с переносом заряда

Термин «хроматография с переносом заряда», ВЭЖХ ПЗ (СТ HPLC, charge-transfer HPLC), является дословным переводом англоязычного термина. Русскоязычный термин «хроматография с переносом заряда» предложен автором, поскольку официального аналогичного термина не существует.

В хроматографии с переносом заряда происходит удерживание и разделение ненасыщенных (в том числе ароматических) органических соединений на неподвижных фазах, содержащих в своей структуре π -донорные/акцепторные фрагменты и/или координационно ненасыщенные ионы (атомы) переходных металлов. Удерживание объясняется образованием лабильных адсорбционных комплексов с переносом заряда π - π и π - d типа за счет так называемых π -взаимодействий (см. Приложение, разд. А.2.6).

Наиболее ярко π -взаимодействия проявляются в неполярных средах, в которых из-за отсутствия сольватации адсорбционные π - π и π - d комплексы наиболее устойчивы. По этой причине подвижные фазы в хроматографии с переносом заряда, как правило, состоят из алифатического углеводорода, например, гексана (основы), и смешивающегося с ним более полярного органического растворителя (добавки).

Здесь, однако, надо понимать, что в режиме ПЗ свойство «полярности» не является существенным для описания адсорбционного поведения ни адсорбатов, ни адсорбента. На первый план выходит сочетание энергетики и геометрии высших занятых и низших свободных молекулярных орбиталей, ВЗМО и НСМО (НОМО, LUMO), взаимодействующих систем.

Сильно не вдаваясь в теорию, можно сказать, что для ароматических соединений удерживание в режиме ПЗ возрастает при увеличении количества π -электронов в сопряженной системе. Удерживание также усиливается введением в ароматическую структуру электрон-донорных и электрон-

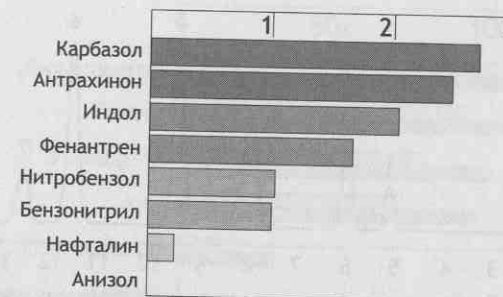


Рис. 5.18. Обобщенная характеристика способности ряда ароматических соединений к удерживанию в режиме ПЗ. Величина для анизолы принята за ноль, для нитробензола — за единицу. Характеристика получена в результате обработки методом главных компонент данных по удерживанию адсорбатов на фазах Chromalite-5HGN (сверхсшитом полистироле), Chiralcel-OD и Pirkle Whelk-O,1 (см. Приложение Б) при использовании элюентов на основе гексана

акцепторных заместителей, обладающих сильным мезомерным эффектом: карбонильной группы, нитро-группы, amino-группы и т.д. Гетероароматические соединения (с неподеленной электронной парой гетероатома, которая встраивается в сопряженную систему) обладают большим удерживанием, чем их полностью «углеродные» аналоги, имеющие вместо гетероатома два углерода с двумя π -электронами.

Хорошей иллюстрацией этих закономерностей является диаграмма на рис. 5.18, показывающая некоторую обобщенную характеристику способности ряда ароматических соединений к удерживанию в режиме ПЗ (величина для анизолы принята за ноль, для нитробензола — за единицу). Типичное разделение простых ароматических соединений в режиме ПЗ приведено на рис. 5.19.

Очевидно, что порядок элюирования адсорбатов (см. рис. 5.19) совершенно не соответствует обращенно-фазовому типу, но немного напоминает нормально-фазовый, если разделение проводить на силикагеле с применением чистого гексана в качестве элюента. Однако, нормально-фазовый тип удерживания здесь не может реализоваться хотя бы потому, что разделение проводится на совершенно неполярном, нейтральном полистирольном адсорбенте. Кроме того, удерживание ароматики в режиме ПЗ значительно превосходит то, которое наблюдалось бы для силикагеля. Так, бензол и стирол, которые при ~ 15% хлористого метилена в гексане прекрасно удерживаются ($k' \sim 1$) и разделяются на сверхсшитом полистироле, на силикагеле выходили бы, не удерживаясь, «в нулевом объеме».

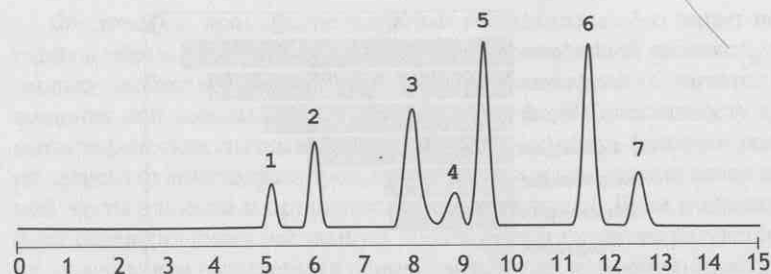


Рис. 5.19. Типичное разделение простых ароматических соединений в режиме переноса заряда. Неподвижная фаза: $250 \times 4,6$ Chromalite 5-HGN (сверхсшитый полистирол). Градиентное элюирование. Подвижная фаза А: гексан-хлористый метилен 95 : 5, подвижная фаза В: гексан-хлористый метилен 60 : 40; 100% А в течение 1 мин, затем 0–100% В за 15 мин. 1 — бензол, 2 — стирол, 3 — анизол, 4 — нафталин, 5 — изотиоцианат, 6 — нитробензол, 7 — фенантрен

Вид элюотропного ряда растворителей для режима ПЗ в общем случае зависит от структуры адсорбата. Для слабополярных адсорбатов, обладающих «мощной» сопряженной π -электронной системой, элюирующая сила растворителя целиком определяется его способностью к π -взаимодействиям. Она увеличивается в ряду гексан < изопропанол << ТГФ < этилацетат < толуол < хлористый метилен (см. рис. 5.20). Наименьшей элюирующей силой обладают алифатические углеводороды, спирты; влага также не оказывает заметного влияния на удерживание. Максимальной элюирующей силой обладают хлороорганические и ароматические растворители, а также кетоны (ацетон).

Главной отличительной чертой неподвижных фаз для хроматографии с переносом заряда является наличие в их структуре либо ароматических фрагментов, либо переходных металлов, способных к взаимодействию с адсорбатами за счет π - π и π - d взаимодействий, соответственно. Фазы первого типа хорошо удерживают и разделяют ароматические и карбонилсодержащие соединения, а фазы второго типа — соединения с кратными (двойными, тройными) связями углерод-углерод, особенно если переходным металлом является серебро.

В режиме ПЗ работают фазы на основе силикагеля с привитыми конденсированными ароматическими соединениями, например, пиреном (пиренил-фаза). Сейчас они применяются достаточно ограниченно, в основном для разделения фуллеренов. В качестве элюентов применяют смеси гексан-толуол и гексан-хлористый метилен; часто используют градиентное элюирование.

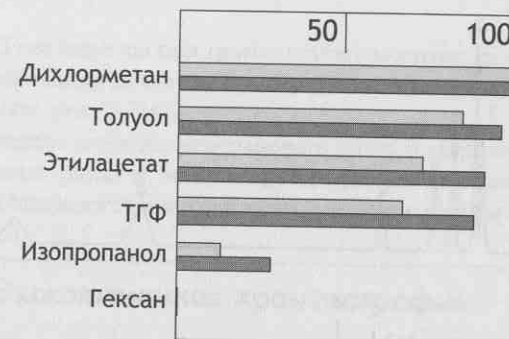


Рис. 5.20. Элюотропный ряд, составленный согласно экспериментальным значениям $\lg k'$ (верхние столбцы) и k' (нижние столбцы) нафталина при элюировании на сверхсшитом полистироле. Для гексана принято значение 0, для дихлорметана — 100

Силикагель, динамически модифицированный нитратом серебра, достаточно давно применяется для разделения триглицеридов и других эфиров жирных кислот. Разделение происходит за счет π - d взаимодействий; удерживание триглицеридов возрастает при увеличении количества двойных связей углерод-углерод, причем инкремент удерживания для сопряженной двойной связи больше, чем для изолированной.

Пористые углеродные адсорбенты также известны достаточно давно; в режиме ПЗ они применяются для фракционирования ряда полихлорированных бифенилов, дибензодиоксинов и дибензофуранов. Главным ограничением этих материалов является крайне затрудненный массоперенос, то есть колонки с углеродными адсорбентами обладают невысокой эффективностью.

Наиболее перспективным адсорбентом для хроматографии с переносом заряда является сверхсшитый полистирол. На этом адсорбенте были проведены разделения ароматических соединений различных классов в различных режимах, которые можно условно разделить на три типа: обращенно-фазовый режим, режим с переносом заряда и смешанный, который является комбинацией первых двух (см. рис. 5.21).

Если в качестве элюентов применять полярные растворители или их смеси с водой, то нейтральный сверхсшитый полистирол начинает вести себя как обращенная фаза очень высокой гидрофобности (см. рис. 5.21a). Так, при работе на сверхсшитом полистироле для получения удерживания, характерного для C18 фазы, долю неполярной добавки в элюенте следует повысить, по крайней мере, вдвое.

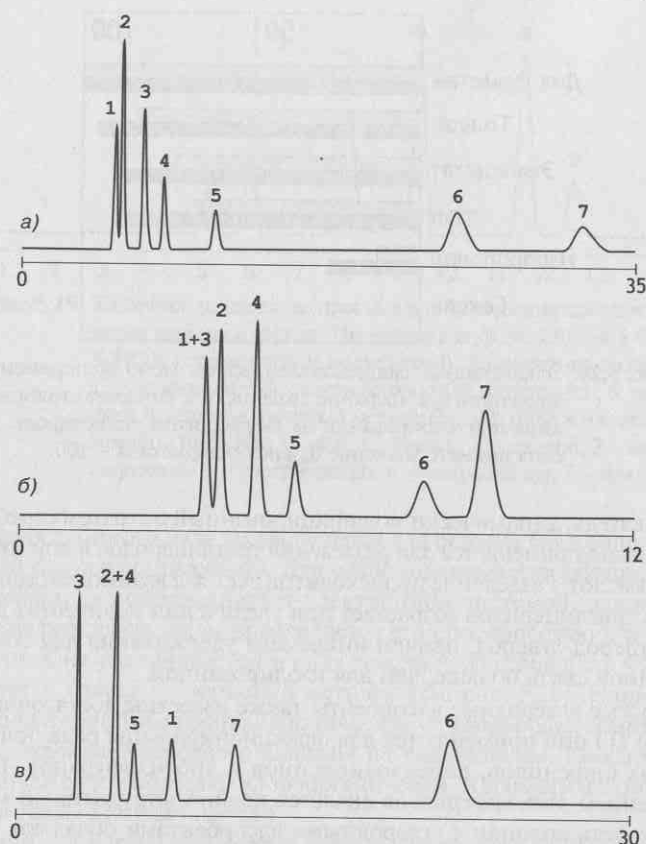


Рис. 5.21. Хроматограмма модельной смеси в различных режимах элюирования. Неподвижная фаза: 250 × 4,6 Chromalite 5-HGN (сверхсшитый полистирол). Обращенно-фазовый режим (а), элюент: ацетонитрил-изопропанол-вода 80 : 15 : 5; «смешанный» режим (б), элюент: хлористый метилен-метанол 1 : 1; режим с переносом заряда (в), элюент: гексан-хлористый метилен 80 : 20. 1 – бензальдегид, 2 – анизол, 3 – кумол, 4 – бромбензол, 5 – нафталин, 6 – антрахинон, 7 – индол. При переходе из ОФ режима в смешанный исчезает инкремент алкильных групп в удерживание (кумол перемещается с третьего места на первое). Уже при переходе от смешанного режима к режиму ПЗ происходит резкое увеличение удерживания сопряженных карбонил-содержащих ароматических соединений (обращение порядка элюирования для пары антрацен/антрахинон, также бензальдегид перемещается со второго на пятое место)

Режим ПЗ реализуется при применении элюентов на основе гексана; порядок элюирования при этом принципиально отличается от обращенно-фазового (см. рис. 5.21б).

Если в качестве элюента использовать смесь полярного растворителя (спирта, ацетонитрила) и, например, хлористого метилена, то порядок элюирования получается «смешанным», имеющим черты обоих режимов (см. рис. 5.21б).

5.7. Эксклюзионная хроматография

Эксклюзионная хроматография является рутинной техникой определения молекулярно-массового распределения (ММР) полимеров, а также применяется для разделения смесей различных олигомерных и полимерных соединений.

В эксклюзионной хроматографии разделение соединений осуществляется за счет разницы в размерах молекул, которая, в свою очередь, обуславливает различную способность к их диффузии в поры неподвижной фазы. Слово «эксклюзия» переводится как «исключение», «выталкивание» (молекул из пор адсорбента).

Молекулы с меньшим размером проводят большее время в порах, в то время как крупные молекулы в это время преимущественно движутся по каналам между частицами адсорбента, не диффундируя в поры. В результате, молекулы небольшого размера удерживаются неподвижной фазой сильнее, а крупные молекулы, «выталкиваемые» адсорбентом, удерживаются слабее.

Можно говорить, что эксклюзионная хроматография не основана на явлении адсорбции, понимая под этим то, что разделяемые соединения не вступают во взаимодействие непосредственно с материалом адсорбента. Здесь неподвижной фазой является элюент, заполняющий поры адсорбента, а подвижной фазой – элюент, движущийся по каналом между частицами адсорбента. Таким образом, эксклюзионную хроматографию с полным правом можно отнести к хроматографическому методу, поскольку в ней реализуется разделение между двумя фазами.

Объем хроматографической колонки, не занятый материалом адсорбента (то есть нулевой объем), можно представить как сумму объема каналов между частицами адсорбента (межгранульный объем $V_{мг}$) и объема пор $V_{п}$ адсорбента.

В адсорбционной хроматографии минимальным объемом удерживания считается нулевой объем, а максимальный удерживаемый объем, в принципе, ничем не ограничен. В эксклюзионной хроматографии, напротив, нулевой объем как раз является максимальным удерживаемым

объемом, а минимальным удерживаемым объемом является межгранульный объем колонки. Поэтому термин «нулевой объем», вполне приемлемый для адсорбционной хроматографии, крайне неудачен для эксклюзионной. Вместо «нулевого объема» далее в этой главе будем пользоваться термином *мертвый объем колонки* V_M .

Таким образом, эксклюзионная хроматограмма начинается при достижении межгранульного объема колонки, в котором элюируются самые большие молекулы, и заканчивается при достижении мертвого объема колонки, в котором элюируются самые маленькие молекулы (см. рис. 5.22). Если адсорбционные взаимодействия с материалом адсорбента полностью подавлены (например, выбором элюента с крайне высокой элюирующей силой), то после мертвого времени никаких соединений элюироваться с хроматографической колонки не должно.

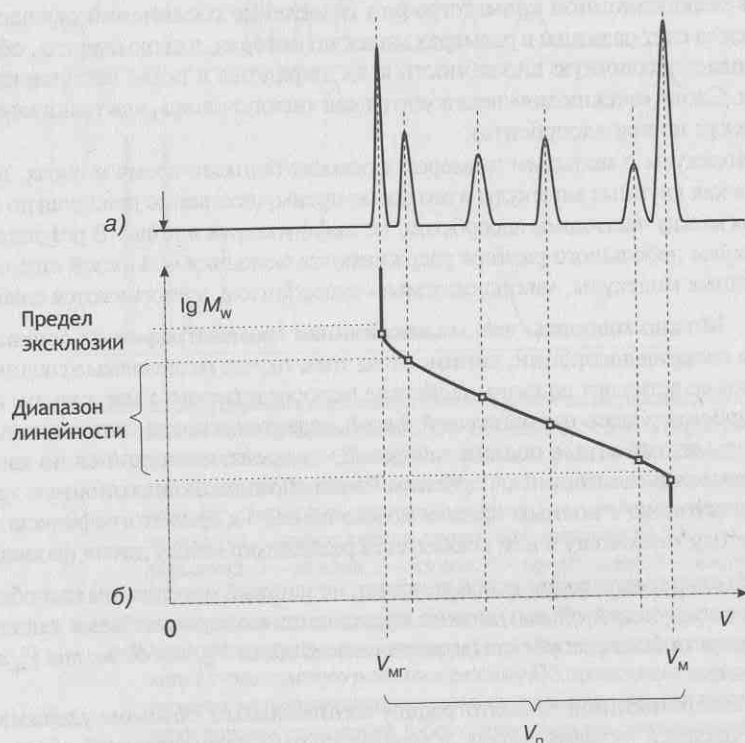


Рис. 5.22. Хроматограмма в эксклюзионном режиме (а) и градуировочная кривая (б)

Параметром, отражающим эффективный размер молекулы соединения, в эксклюзионной хроматографии принято считать логарифм его молекулярной массы. Таким образом, с этого момента мы будем говорить не о «больших молекулах», а о «соединениях с большой молекулярной массой».

Зависимость между объемами эксклюзии и логарифмом молекулярных масс соединений (для данной эксклюзионной колонки и данного типа разделяемых соединений) называется *градуировочной кривой* (ее не надо путать с градуировочной кривой для количественного анализа). Именно при помощи градуировочной кривой проводится расчет молекулярных масс соединений по их объемам эксклюзии, полученным из хроматограммы (см. рис. 5.22б).

Разделение в эксклюзионном режиме может произойти только в том случае, если размер пор адсорбента соответствует размеру разделяемых молекул. В чем-то по смыслу это напоминает явление дифракции, которое наблюдается только при соответствии длины волны размеру препятствий на пути ее распространения.

Количественной характеристикой способности колонки к эксклюзионным разделениям соединений с различными молекулярными массами является доля объема, которая приходится на единицу разницы логарифмов молекулярных масс разделенных соединений. Эта характеристика называется *разделительной емкостью*; она численно равна тангенсу угла наклона калибровочной кривой (в выбранной точке). Другими словами, чем «горизонтальнее» линейный участок калибровочной кривой, тем лучше разделяются соединения с соответствующими этому участку молекулярными массами. Разделительная емкость является своеобразным аналогом селективности в адсорбционной хроматографии.

Верхним пределом эксклюзии (часто его называют просто пределом эксклюзии) называют максимальную молекулярную массу соединений, молекулы которых еще могут проникать в поры данного адсорбента и удерживаться им. *Нижним пределом эксклюзии* будем называть молекулярную массу, ниже которой молекулы проникают во все доступные поры.

Диапазоном линейности называют диапазон молекулярных масс, в границах которого калибровочная кривая линейна. Как правило, эксклюзионную фазу применяют именно для разделений соединений с молекулярной массой внутри диапазона линейности, поскольку в этом случае точность результатов определения молекулярной массы или ММР оказывается наилучшей.

Высокого диапазона линейности эксклюзионных упаковок можно достичь, по крайней мере, двумя путями.

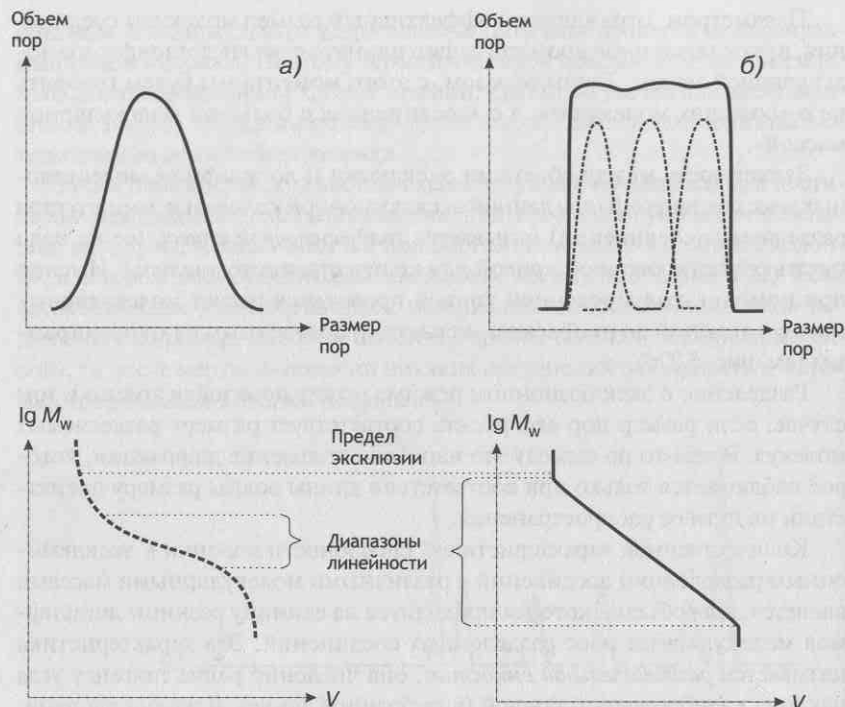


Рис. 5.23. Соответствие распределения пор по объему градуировочной кривой эксклюзионной фазы

Первый путь заключается в последовательном соединении нескольких колонок, заполненных адсорбентами с различными средними диаметрами пор. Он хорош тем, что вместе с диапазоном линейности позволяет увеличить общий объем пор. Минус заключается в том, что он чисто технически не очень удобен (требует использования больших объемов растворителей, производительных насосов), а также дорог, поскольку необходимо приобретать несколько колонок.

Можно решить задачу другим путем: скомбинировать несколько разных адсорбентов таким образом, чтобы эксклюзионная упаковка имела поры всех возможных размеров, причем примерно в равных объемах (см. рис. 5.23). Как правило, современные эксклюзионные колонки с широким диапазоном линейности получают этим методом. Поскольку их разделительная емкость значительно ограничена высоким диапазоном линейности, разделение на современных колонках стараются увеличить

за счет улучшения качества упаковки адсорбента, то есть их эффективности.

Таким образом, хороший эксклюзионный адсорбент должен иметь высокую пористость и необходимый размер пор (см. рис. 5.24а). Под конкретную же задачу эксклюзионную колонку следует подбирать таким образом, чтобы обеспечить оптимальное соотношение между ее диапазоном линейности и разделительной емкостью (см. рис. 5.24б). Например, для рутинных определений соединений с приблизительно известным ММР чаще применяют эксклюзионные фазы с высокой разделительной емкостью (см. рис. 5.24б, пунктирная линия), а для исследований — с высоким диапазоном линейности (см. рис. 5.24б, непрерывная линия).

Достаточно интересные приложения можно выполнить на эксклюзионных упаковках с микропористыми частицами, где микропорами являются, например, структурные ячейки шитого полимера. Их средний диаметр составляет 20–30 ангстрем, то есть он сопоставим с размером больших молекул. Таким образом, эксклюзионная хроматография на микропористых неподвижных фазах может применяться для разделения не только полимерных, но и «обычных» мономерных молекул по размеру (см. рис. 5.25 и 5.26).

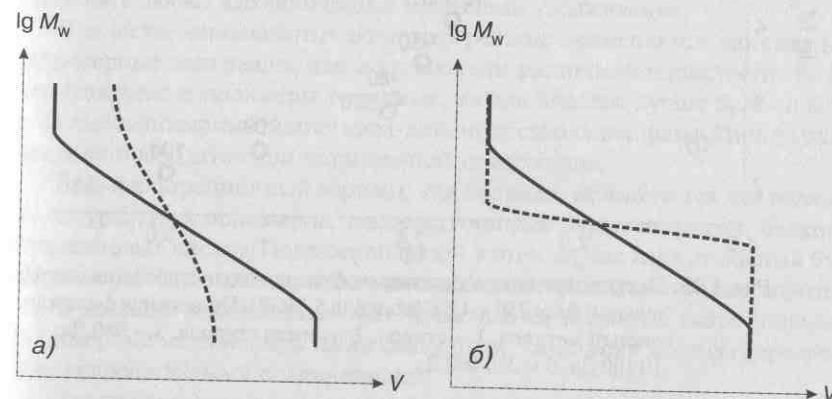


Рис. 5.24. Градуировочные кривые для различных эксклюзионных колонок. Подходящая (непрерывная линия) и неподходящая (пунктирная линия) для эксклюзионных разделений колонки (а). Эксклюзионная колонка с высокой разделительной емкостью (пунктирная линия) и с высоким диапазоном линейности (непрерывная линия) (б)

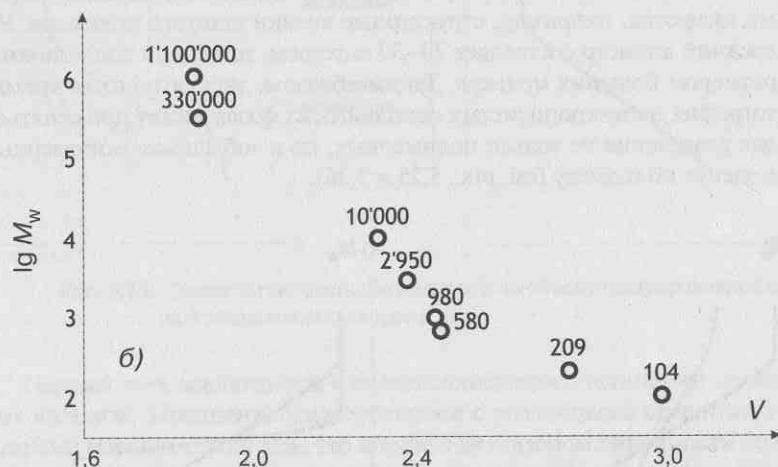
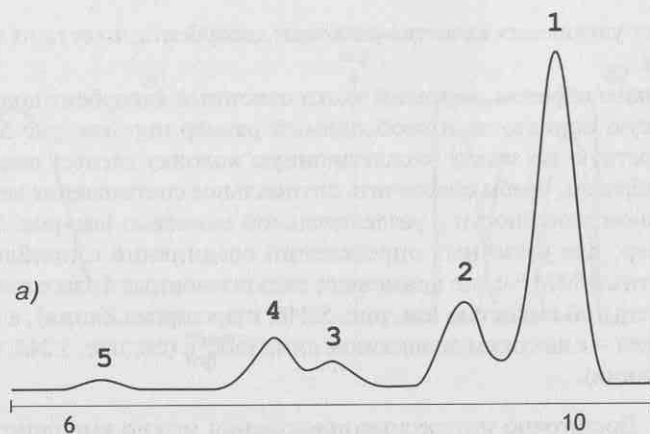


Рис. 5.25. Эксклюзионное разделение олигомеров полистирола на неподвижной фазе $250 \times 4,6$ Chromalite 5-HGN. Подвижная фаза: хлористый метилен. 1 — стирол, 2 — димер стирола, 3 — 980 Да, 4 — 10 100 Да, 5 — 330 000 Да

По полярности применяемых подвижных фаз эксклюзионные методы можно разделить на водные, гель-фильтрационные, ГФХ (aqueous method, gel-filtration) и неводные, гель-проникающие, ГПХ (non-aqueous method, gel-permeation). Они несколько различаются по методическим подходам, но ничем не отличаются друг от друга по сути.

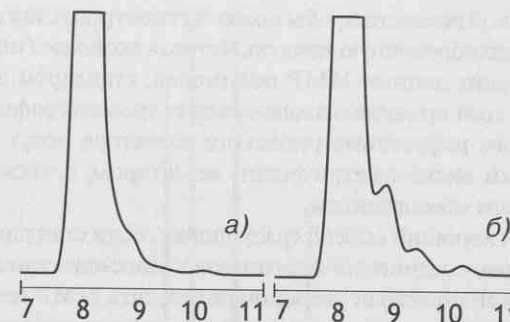


Рис. 5.26. Эксклюзионное разделение компонентов растительного масла: (а) свежее масло, (б) стоявшее на свету в течение 2 мес. Неподвижная фаза: $250 \times 4,6$ Chromalite 5-HGN. Подвижная фаза: хлористый метилен

Гель-проникающий вариант эксклюзионной хроматографии применяется, как правило, для анализа различных полимеров. В качестве подвижных фаз применяются органические растворители: ТГФ (тетрагидрофуран), хлороформ, толуол, ГФИП (гексафторизопропанол), ДМСО (диметилсульфоксид). С одной стороны, они должны обеспечивать необходимую растворимость полимерного образца; с другой стороны, они должны полностью подавлять любые адсорбционные механизмы удерживания.

В качестве неподвижных фаз в этом режиме применяются как сшитые полимерные материалы, так и силикагели различной пористости. Если анализируемые полимеры полярные, то для анализа лучше брать нейтральные неполярные полистирол-дивинилбензолные фазы. Иногда разделения проводятся при повышенной температуре.

Гель-фильтрационный вариант, как правило, применяется для анализа натуральных полимеров: водорастворимых олигосахаридов, белков, нуклеиновых кислот. Подвижной фазой в этом случае служит водный буферный раствор, иногда с небольшой добавкой органического растворителя. В качестве неподвижных фаз применяются пористые гидрофильные полимерные материалы, а также силикагели, химически модифицированные гидрофильными соединениями.

Для градуировки эксклюзионных фаз часто применяют стандартные образцы полистиролов и полиэтиленгликолей для ГПХ и стандартные образцы декстринов — для ГФХ. Если градуировка проводится не по тому соединению, которое анализируется, то в полученную по стандартам калибровочную кривую необходимо ввести поправку, вычисляемую из значения характеристической вязкости анализируемого полимера. Знание

характеристической вязкости пробы позволяет построить так называемую универсальную калибровочную кривую, которая позволяет определить из хроматографических данных ММР полимеров, стандарты для которых отсутствуют. По этой причине эксклюзионные хроматографы кроме специализированного рефрактометрического детектора могут комплектоваться проточным вискозиметрическим детектором, а также специальным программным обеспечением.

Есть и другой хороший способ градуировки, если стандартные образцы анализируемых соединений отсутствуют. Масс-спектрометрический метод MALDI-TOF позволяет уверенно определять ММР различных полимерных молекул. Проведя совместный анализ реперных образцов методом MALDI-TOF и эксклюзионной хроматографией, можно единожды откалибровать применяемую колонку и уже в дальнейшем применять именно хроматографию как метод для рутинных определений. К сожалению, проведение MALDI-TOF измерений само по себе требует большого объема исследований, особенно для новых полимеров. Кроме того, метод ограничен молекулярными массами до 500 кДа.

5.8. Ион-парные режимы хроматографии. Мицеллярная хроматография

Ионная пара — это комплекс кислоты (донора протона) и основания (акцептора протона), в котором протон преимущественно находится рядом с акцептором. Можно рассматривать ионную пару как комплекс с очень сильной водородной связью. Такой комплекс, надо сказать, может существовать только в растворителе с низкой диэлектрической проницаемостью. В водной среде ионные пары частично или полностью диссоциируют, то есть донор протона превращается в анион, а акцептор — в катион; их взаимодействие можно рассматривать как притяжение двух разноименных зарядов.

Смысл *ион-парной хроматографии* заключается в том, чтобы увеличить удерживание кислотных (или основных) соединений путем введения в элюент ион-парного основного (или кислотного) органического реагента. При этом подразумевается, что ионная пара обладает значительно большим удерживанием, чем исходное соединение.

Ион-парные режимы существуют в обращенно-фазовой, гидрофильной, нормально-фазовой хроматографии и хроматографии с переносом заряда. Но, честно говоря, подавляющее большинство разделений в ион-парных условиях осуществляется в обращенно-фазовом режиме; все остальное является в той или иной мере экзотикой.

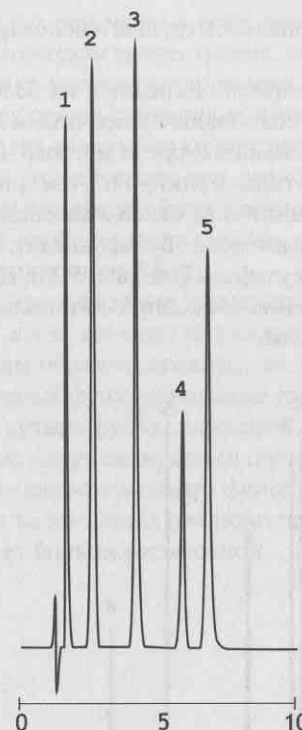


Рис. 5.27. Разделение аденозин-фосфатов методом ион-парной обращенно-фазовой хроматографии. Неподвижная фаза: 100 × 4,6 Wakosil C18 RS, 3 мкм. Элюент: 30% метанола в 20мМ водном растворе дигидрофосфата калия и 5 мМ ТБА (тетрабутиламмония). 1 — аденозин, 2 — АМФ, 3 — АДФ, 4 — бензиловый спирт, 5 — АТФ. www.sge.com

И по стечению обстоятельств, именно в обращенно-фазовом режиме исторический термин «ион-парная ОФ хроматография» теряет свой смысл. Ведь в водных средах ионные пары, фактически, перестают существовать: ионогенные аналиты превращаются в ионы, а ион-парный реагент — в противоион. Ион-парный реагент подбирается таким образом, чтобы он хорошо удерживался C18 фазой, и поверхность обращенно-фазового адсорбента становится частично заряженной. В результате, механизм удерживания становится смешанным — обращенно-фазовым плюс ионообменным.

Ион-парными реагентами для ион-парной ОФ хроматографии являются ионные поверхностно-активные вещества, молекулы которых со-

стоят из ионной функциональной группы и неполярного фрагмента, чаще алкильной цепи.

Для разделения органических кислот и их солей в подвижную фазу добавляют, как правило, соли (чаще прозрачные в УФ области сульфаты) четвертичных катионов аммония, среди которых наибольшее распространение получил тетрабутиламмоний, ТБА (см. рис. 5.27). При разделении органических оснований и их солей в качестве противоионов обычно применяют соли алифатических сульфокислот: чаще додецилсульфат, реже гептил- или гексилсульфаты (см. рис. 5.28). Для ион-парного обращенно-фазового разделения свободных аминокислот применяют соли перфторкарбоновых кислот.

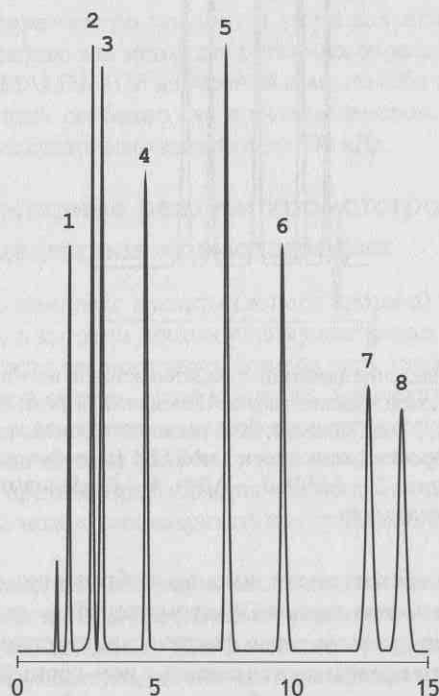


Рис. 5.28. Разделение модельной смеси водорастворимых витаминов. Неподвижная фаза: 150 × 4,6 Wakosil C18 RS, 5 мкм. Элюент: ацетонитрил-(5 мМ гексилсульфата в 0,1% водной фосфорной кислоте) 10 : 90. 1 – аскорбиновая кислота, 2 – никотиновая кислота, 3 – никотинамид, 4 – пиридоксин, 5 – кофеин, 6 – тиамин, 7 – биотин, 8 – рибофлавин. www.sge.com

В растворах некоторых ион-парных реагентов может происходить образование мицелл. Критическая концентрация, выше которой начинается этот процесс, называется критической концентрацией мицеллообразования, ККМ. Простое правило: режим считается ион-парным, если образование мицелл еще не происходит, то есть при концентрации ион-парного реагента ниже ККМ. Вообще, концентрация ион-парного реагента в водном буфере для приготовления подвижной фазы обычно не превышает 5–10 мМ; как правило, даже для наиболее гидрофобных реагентов типа додецилсульфата эта концентрация ниже ККМ.

Ион-парные обращенно-фазовые хроматографические системы стабильны в тех случаях, когда аналиты полностью ионизированы при pH подвижной фазы. Таким образом, аналиты, желательно, должны содержать сильно ионизируемые функциональные группы (четвертичную аммонийную группу или сульфогруппу) либо сами должны быть органическими ионами. Неудачно могут закончиться попытки «зацепить» аналиты за достаточно слабые (карбоксильные, фенольные) функциональные группы. Удерживание, несомненно, увеличится, но повторяемость времен удерживания может быть недостаточной.

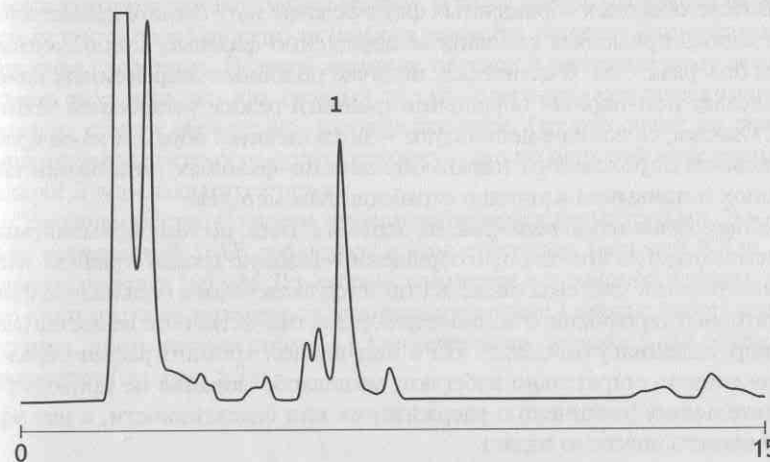


Рис. 5.29. Анализ экстракта коры йохимбы. Основной пик – алкалоид йохимбин, соседние с ним пики – структурные аналоги, не разделяющиеся без ион-парной добавки в элюент. Неподвижная фаза: 250 × 4,6 Inertsil ODS. Элюент: ацетонитрил-водный буфер 45 : 55. Водный буфер: 5 мМ водный раствор додецилсульфата, pH 2,5 фосфорной кислотой

Наиболее яркие результаты применения ион-парного режима достигаются в тех случаях, когда исходная обращенно-фазовая система не может справиться с разделением структурно подобных соединений, содержащих ионизированные функциональные группы. Применение ион-парного режима в большинстве случаев позволяет решить эту проблему (см. рис. 5.29).

При переходе от исходной обращенно-фазовой системы к ион-парной удерживание аналитов сильно увеличивается. Для обеспечения приемлемого удерживания подвижная фаза для ион-парной хроматографии должна содержать значительно большую объемную долю модификатора, чем в исходной системе (обычно в два-три раза больше первоначальной).

Надо отметить, что применение ион-парного режима далеко не всегда бывает удобным. Этот режим не совместим с градиентным элюированием, с масс-спектрометрическим детектированием. Да и при изократическом элюировании с УФ детектированием на хроматограммах всегда присутствуют системные пики, нередко мешающие разделению. Системные пики (как положительные, так и отрицательные) обусловлены сложными равновесиями в хроматографической системе с участием ион-парного реагента.

Вместо обычных обращенных фаз в режиме ион-парной хроматографии можно применять смешанные обращенно-фазовые/ионообменные фазы (см. разд. 5.5). Фактически, наличие подобных современных колонок делает ион-парный обращенно-фазовый режим устаревшей техникой. Однако, ее все еще используют — пока главным образом из-за сравнительной дороговизны новых обращенно-фазовых/ионообменных колонок и привычки к хорошо отработанным методам.

Мицеллярная хроматография, на первый взгляд, по типу применяемых систем похожа на ион-парную обращенно-фазовую хроматографию. Модифицирование системы также достигается введением в подвижную фазу достаточно гидрофобного ионного поверхностно-активного вещества (например, додецилсульфоната). Но в ион-парной хроматографии образования мицелл старательно избегают: мицеллообразование не приводит к значительному увеличению удерживания или селективности, а вот эффективность ощутимо падает.

В мицеллярной хроматографии, наоборот, стараются всячески увеличить стабильность мицелл. Казалось бы, зачем? — ведь от этого только падает эффективность разделения. Ответ таков: мицеллярные системы крайне устойчивы к любым загрязнениям. Такие системы пригодны для анализа различных образцов (например, биологических) без или с минимальной подготовкой пробы.

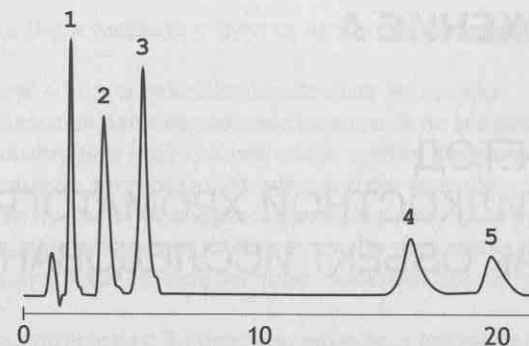


Рис. 5.30. Хроматограмма водорастворимых витаминов в режиме мицеллярной хроматографии. Неподвижная фаза: 150 × 4 Hypersil ODS. Элюент: 4% 1-пентанола в 0,1 М растворе додецилсульфата натрия, pH 3. 1 — рибофлавин; 2 — никотинамид; 3 — пиридоксин; 4 — пиридоксамин; 5 — тиамин. L. Monferrer-Pons et. al. / J.Chromat. A. 984 (2003) 223–231

Само модифицирование в мицеллярной хроматографии, по сути, является контролируемым загрязнением. В то же время, буферный раствор ионогенного поверхностно-активного вещества является универсальным моющим средством. По этой причине переход к мицеллярному режиму можно рассматривать как удачный способ «спасения» критически загрязненных, старых обращенно-фазовых колонок. Отсюда совет: не ставьте мицеллярную систему на новую колонку — это по меньшей мере расточительно! Лучше возьмите старую.

Увеличения стабильности мицелл добиваются двумя путями. Во-первых, ионогенный ПАВ добавляют в концентрации, большей ККМ, например, порядка 100 мМ. Во-вторых, в качестве неполярной добавки вместо ацетонитрила применяют длинноцепочечные спирты: изопропанол, бутанол, изоамиловый спирт — в концентрации порядка 5–10 объемных процентов (см. рис. 5.30).

ПРИЛОЖЕНИЕ А

МЕТОД ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ КАК ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

А.1. Вводный курс лекций по общей химии

Предлагаемый читателям в части А.1 Приложения А курс лекций по общей химии читался Сергеем Николаевичем Сычевым для первокурсников нехимических специальностей Орловского государственного технического университета: будущих конструкторов, технологов металлообработки, радиоэлектронщиков, компьютерщиков и т.д.

Студенческий состав и весьма короткое время соприкосновения обучающихся с химической наукой (один семестр) накладывают определенный отпечаток на содержание лекций: в них почти нет химии как таковой (предполагается, что химию студенты изучали в школе), но зато есть широкий простор для фантазии преподавателей.

Конечно, никакая книга не заменит живого общения студентов с лектором, тем не менее, мы постарались сохранить ту теплую и непосредственную атмосферу первой пары в понедельник или последней пары в субботу, когда обычно бывают лекции по химии для студентов нехимических специальностей.

Жанр лекции хорош для автора тем, что освобождает его от обязанности следовать устоявшимся канонам и разрешает излагать материал так, как он видит его сам.

А.1.1. Модель как способ познания мира

Прежде, чем мы перейдем непосредственно к изучению вопросов, указанных в программе курса, давайте порассуждаем на темы, более понятные и близкие каждому из нас. Представьте следующую картину: светит солнышко, зеленеет лужок. И вот на этом самом лужке лежит железный прут. Вдруг около прутка оказывается Вы со штангенциркулем в правой руке.левой рукой Вы поднимаете прут и начинаете что-то у него измерять штангенциркулем.

— Что же Вы измеряете у прутка штангенциркулем? — спрашивает лектор.

— Диаметр! — хором отвечает понятливая аудитория.

Рассмотрим еще один вопрос: все равно или не все равно прутку, есть ли у него диаметр или нет? Скорее всего, прутку все равно, так как и без понятия «диаметр» прутки существуют вполне успешно.

Какому же предмету не все равно, есть ли у него диаметр или нет? Очевидно: цилиндру, шару, окружности и т.д. Во всех этих предметах, но фигурах, являющихся *геометрическими моделями*, диаметр существует *по определению*.

Итак, давайте еще раз: Вы берете в левую руку прут, в правую — штангенциркуль, *присваиваете прутку модель цилиндра* и с помощью штангенциркуля измеряете у прутка *параметр модели — диаметр*. Таким образом, совершенно автоматически Вы занимаетесь моделированием прутка.

Таких примеров можно привести множество, и все они дают один и тот же вывод: *человек познает мир с помощью построения и манипуляций абстрактными моделями*. Наиболее распространенным примером набора используемых человеком абстракций является человеческий язык.

Абстракции, с помощью которых человек познает мир, опираются на способность видеть, слышать, осязать и обонять мир в определенной области электромагнитного излучения, звуковых колебаний и т.д.

Пусть в аудитории присутствуют студенты трех типов:

- студенты, видящие своего преподавателя в видимой части электромагнитного излучения (это легко представить — достаточно проснуться);
- студенты, видящие преподавателя в инфракрасной области (представьте себе портрет преподавателя работы импрессиониста);
- студенты, видящие преподавателя в рентгеновской области электромагнитного излучения (скелет, а вокруг него дымок).

Какой же образ, какая же модель преподавателя верна? Верны, до определенной степени, все эти модели, а еще лучше — их совокупность. Какой же преподаватель *на самом деле*? Последний вопрос лишен смысла, так как не существует ограничений по количеству параметров все более сложных моделей, описывающих природное явление (преподаватель — тоже природное явление).

Кроме того, все природные явления изменяются во времени, поэтому модели, описывающие то или иное явление, в идеале должны содержать так называемую «стрелу времени» (поясним попозже).

Теперь рассмотрим конкретный пример: последовательно усложняющиеся модели яблока. Модель первая — рисунок яблока (круглое, жел-

тое). Модель вторая, более точная — рисунок яблока и его описание: «яблоко зрелое, сорт «грушевка», сладкое на вкус, масса 120 г». Модель третья, еще более точная — рисунок и более подробное описание: «яблоко зрелое, сорт «грушевка», сладкое на вкус, масса 120 г, состоит из воды, углеводов, содержит органические кислоты, витамины, микроэлементы».

Модель четвертая — попроще, но уже через некоторое время t (учет времени): яблоко, укушенное через некоторое время t .

Таким образом, можно сделать очень важные выводы:

- 1) человек познает мир с помощью абстрактных моделей, лучше или хуже описывающих реальные объекты или процессы;
- 2) вид этих моделей и степень взаимопонимания людей, пользующихся одинаковыми понятиями, зависит от того, насколько близки сенсорные и интеллектуальные особенности людей;
- 3) зрительный образ и понятие «на самом деле» при исследованиях заменяются моделью зрительного образа в совокупности со словесным и (или) математическим описанием различных свойств объекта;
- 4) так как абсолютно все свойства объекта описать невозможно, из массы свойств вычлениаются те, которые интересуют людей в конкретной житейской или научной ситуации.

Какое же отношение имеют наши рассуждения к химии? Самое прямое! Теоретическую химию, как любой продукт интеллекта человека, мы будем рассматривать как систему моделей, лучше или хуже описывающих реальное явление. Любая модель несет на себе отпечаток личности человека, ее придумавшего, и эпохи, в которой конкретная модель была выдвинута и обоснована. Только при учете этих факторов теоретическая химия перестает быть темной и непонятной наукой, так как в основе любой модели лежат простые и доступные всем идеи.

А.1.2. Модель химии как науки

Понятие химии является основной моделью химии, так как выделяет из множества явлений те, которые исследуются и используются химиками. Давайте посмотрим, какое определение химии предлагают нам авторы различных учебников и какую модель химии можно построить исходя из этих определений. Итак...

1. «Химия есть наука об особой форме движения материи, характерной особенностью которой является качественное превращение веществ: в процессе химической реакции одни вещества как бы исчезают, а вместо них появляются новые вещества с новыми свойствами». Такое определение химии можно сразу помещать в юмористический журнал.

2. «Химия — это наука о превращениях веществ». Немного коротковато для построения модели, но у этого определения есть продолжение. «...Она (химия) изучает состав и строение веществ, зависимость свойств веществ от их состава и строения, условия и пути превращения одних веществ в другие». Хорошее определение, но слишком длинное для моделирования.

3. «Химия — наука о химических элементах и их соединениях, о механизме образования молекул веществ, о происходящих в результате движения атомов изменениях состава, внутренней структуры и реакционной способности веществ». Последнее определение является типичным примером непонимания принципов построения любой науки, прикрытой наукообразными терминами.

4. «Химия — наука о веществах и их превращениях». Это наиболее удачное определение для использования его в качестве модели построения химии.

В этом предложении не определены два понятия: «наука» и «вещество». Заглянем в толковый словарь русского языка Ожегова: «Наука — это система знаний о закономерностях развития природы, общества и мышления, а также отдельная отрасль таких знаний». Это действительно (без юмора) замечательное определение! Согласно этому толкованию ни физика, ни химия науками не являются. Действительно, содержатся ли закономерности развития природы в законах Ньютона, в квантовой механике или периодическом законе Менделеева? Закономерности есть, а развития — нет.

За исключением нескольких разделов физики и химии — например, учения о развитии Вселенной или неравновесной термодинамики (об этих предметах мы побеседуем позже), в большинстве предложенных закономерностей отсутствует время, в течение которого и происходит развитие природы. Мало того, высшим достижением в физике (в химии — в меньшей степени) до сих пор считается описание явлений природы с помощью симметричных аналитических зависимостей, не допускающих изменения этих закономерностей во времени. Такой подход во многом связан с головкружительным прогрессом современной техногенной цивилизации, как раз находящейся в явной дисгармонии с природой. Другими причинами могут быть: краткость человеческой жизни, небольшой срок современных систематических исследований и создание неудачных специальных условий при проведении эксперимента.

Так как все немножко устали, давайте пофантазируем на заданную тему.

Рассмотрим следующую ситуацию: научное сообщество комаров решило исследовать лесника, проживающего в избушке недалеко от болота. Для исключения влияния посторонних факторов (солнце, отсутствие тени и повышение температуры приводят к понижению ум-

ственных способностей комаров днем) эксперимент решили проводить по ночам (как это похоже на ученых из кинофильмов и романов!).

Первое поколение ученых-комаров, прожившее длинную жизнь длительностью в целых три дня, дало первую информацию о параметрах лесника: две руки, две ноги, крыльев нет, все время спит, не жужжит (но зато храпит). Второе поколение уточнило эту информацию, но незначительно (есть еще голова).

Наконец, трехсотое поколение во главе с самым авторитетным ученым постановило: полученную воспроизводимую модель все время спящего лесника считать абсолютным законом природы (две руки, две ноги, голова, спит, храпит). Комаров, летавших днем под солнышком и видевших лесника бодрствующим, объявили солнцеманами и отправили на принудительное лечение.

Что же представляет собой химия как система знаний? Во-первых, химия — наука преимущественно экспериментальная, методы и приемы которой во многом напоминают поваренную книгу (впрочем, кулинария — это тоже химия, только пищевая).

Во-вторых, в химии преимущественно исследуются и используются закономерности, имеющие прикладное, технологическое значение. В результате таких исследований создаются новые, не существующие в природе, материалы на основе технологических процессов, не имеющих аналогов в природе. В этом плане химия — один из наиболее мощных факторов развития техногенной цивилизации.

А как же закономерности развития природы? Вот с этим, пожалуй, у химиков (впрочем, как и у физиков) наблюдаются определенные трудности.

Таким образом, в курсе общей химии в основном мы будем изучать закономерности (модели), которые являются базовыми для многих технологических процессов и имеют большое прикладное значение.

А.1.3. Понятие о веществе.

Силы, приводящие к образованию макротел

«Возьмем, например, молекулу NaCl ...»
(Из лекции очень уважаемого химика)

Определение вещества является базовым для всей химии. Приведем несколько понятий вещества, данных в различных учебниках.

1. «Вещество — вид материи; то, из чего состоит физическое тело» (Ожегов. Толковый словарь).

2. «Вещество — это конкретный вид материи, обладающей массой покоя, характеризующейся при данных условиях физическими и химическими свойствами» (Зубович. Неорганическая химия).

3. «Вещество — отдельный вид материи, обладающий при данных условиях определенными физическими свойствами» (Глинка. Общая химия).

4. «Вещество — форма материи, состоящая из частиц, имеющих собственную массу — массу покоя (электроны, атомные ядра, атомы, молекулы)» (Корвин. Общая химия).

Наиболее обоснованным определением вещества, на наш взгляд, является последнее. Являются ли веществами пучки электронов, протонов или нейтронов? Согласно предложенному определению — да. Является ли веществом кусок мела? Тоже — да.

Однако химики чаще имеют дело все-таки с «куском мела», а не с пучками электронов или нейтронов, то есть химики преимущественно работают с макротелами, имеющими в своем составе сотни тысяч, миллионы, миллиарды и т.д. более мелких частиц, имеющих массу покоя.

Таким образом, на замечательный вопрос учителя химии или физики: «Из чего состоят вещества?» можно смело ответить: «Из вещества!» И то правда — из чего состоит электрон? Из электрона!

Исходя из наших рассуждений, вопрос: «Из чего состоят вещества?» необходимо заменить на другой: «Из чего состоят макротела?»

Для того, чтобы ответить на этот вопрос, необходимо построить иерархию моделей описания макротел.

Итак, макротела состоят из:

- химических частиц — первая ступень моделирования;
- химические частицы состоят из электронов и ядер — вторая ступень моделирования;
- ядра состоят из протонов и нейтронов — третья ступень моделирования.

Согласно такой иерархии на вопрос Вашего преподавателя на экзамене:

- Из чего состоят макротела? — вы можете на вопрос ответить вопросом:
- На какой ступени моделирования?

Преподаватель будет вынужден рассказать Вам, о какой ступени моделирования идет речь:

- Э-э-э-э, ну... электроны, нейтроны, протоны...

После этого смело повторите за экзаменатором, только бойко и без этих «э-э-э-э-э»:

- Электроны! Нейтроны! Протоны!

Построенная нами иерархия позволяет дать определения основным химическим частицам (Татевский), с которыми имеют дело химики: атомам, атомным ионам, молекулам и молекулярным ионам.

Теперь дадим несколько определений.

Атомом называется электронейтральная химическая частица, имеющая в своем составе одно ядро.

Молекулой называется электронейтральная химическая частица, имеющая в своем составе два или большее количество ядер.

Атомным ионом называется электроразряженная химическая частица, имеющая в своем составе одно ядро.

Молекулярным ионом называется электроразряженная химическая частица, имеющая два или большее количество ядер.

Молекулярный или атомный ион, имеющий положительный заряд, называется *катионом*.

Молекулярный или атомный ион, имеющий отрицательный заряд, называется *анионом*.

Из чего же все-таки состоит поваренная соль? С точки зрения химика, кристаллы поваренной соли (NaCl) состоят из атомных ионов: катионов Na^+ и анионов Cl^- .

Есть еще один вопрос, на который простого ответа не существует: «Когда начинается макротело? Сколько частиц нужно, чтобы получился кристалл поваренной соли? Одна, две, сто, тысяча, миллион?»

Четкой границы не существует, однако считается (Татевский), что макротело должно состоять не менее чем из нескольких десятков тысяч химических частиц. Образования, содержащие от нескольких десятков до нескольких тысяч химических частиц называются *кластерами*. Теперь их часто называют модным словом «наночастицы». Кластеры занимают промежуточное положение между химическими частицами и макротелами.

Итак, мы установили иерархию моделей построения макротела. В дальнейшем при рассмотрении строения макротел мы будем оперировать моделями первого и второго уровня: ядра, электроны и химические частицы.

Общей моделью сил, приводящих к образованию макротел, являются электромагнитные взаимодействия. Действительно, в основе модели образования химических частиц из электронов и ядер лежат электромагнитные взаимодействия, и в основе модели образования макротел из химических частиц также лежат электромагнитные взаимодействия.

В общем случае электромагнитные взаимодействия описываются уравнениями Максвелла. Уравнение Шредингера описывает взаимодействия в системе из ядер и электронов также при помощи электромагнитных взаимодействий, имеющих, однако, дискретный и направленный характер.

Электромагнитные взаимодействия, приводящие к образованию макротел из химических частиц, получили название *ван-дер-ваальсовых взаимодействий*. Упрощенные модели таких взаимодействий (ориентационные, индукционные, дисперсионные) мы рассмотрим позже. Уравнение Шредингера будет рассмотрено нами в разделе «Строение атомов и молекул».

Более тридцати лет назад, изучая в школе на уроках физики законы идеальных газов, я искренне возмущался наличием «несущественных» поправок к изучаемым законам за счет каких-то ван-дер-ваальсовых взаимодействий, явно нарушающих всеобъемлющий закон природы. В университете со скукой учил понятие о так называемых «вириальных коэффициентах» в уравнении Ван-дер-Ваальса.

Позднее обнаружилось, что ван-дер-ваальсовы взаимодействия являются основой модели построения реальных макротел, и стало непонятно, как пользоваться замечательными законами идеальных газов. Вот такая грустная история — а все потому, что к концу лекции все устали.

А.2. Физико-химические взаимодействия в хроматографической системе

«... Просто окружающий мир слишком часто подтверждает странное правило: чем давать вещам объективную оценку, лучше воспринимать их, как тебе удобно, — и приблизиться к истинному пониманию этих вещей».

(Харуки Мураками. Конец света)

Жидкостная хроматография является физико-химическим методом, основанном на принципе различия во взаимодействиях хроматографируемых соединений как с неподвижной, так и с подвижной фазами. Оптимизация хроматографических условий разделения является, по сути, регулированием целого комплекса физико-химических процессов, определяющих удерживание веществ и селективность их разделения.

При рассмотрении этих процессов отправной точкой следует считать факт, что природа всех химических и физико-химических взаимодействий является единой, электродинамической. Любое взаимодействие химических частиц является взаимодействием их электромагнитных полей.

В хроматографической системе реализуются лишь слабые взаимодействия, энергия которых сопоставима по величине с энергией теплового движения. Вообще, низкая энергия взаимодействия является отличительной чертой, спецификой любого физико-химического метода. По этой причине основное внимание при изложении будет уделено тем типам взаимодействий, которым, к примеру, в органической химии уделяется минимальное внимание или не уделяется внимания вовсе.

Межмолекулярные взаимодействия будем описывать в терминах двух различных моделей: электростатической и метода молекулярных орбита-

лей. Конечно, ряд явлений одинаково плохо описывается и одной, и другой моделью — к примеру, водородная связь. Но здесь пока вряд ли что-то можно сделать.

Мне кажется, что просто всегда надо помнить, что любое химическое явление суть взаимодействие электромагнитных полей. Все математические абстракции вроде «дипольного момента» или «молекулярной орбитали» просто помогают разобраться в его результате, то есть в явлении непосредственно наблюдаемом. Если какая-то абстракция плохо подходит — что же, сильно расстраиваться, наверное, здесь не надо.

Сначала о более простом — об электростатике. Итак, причиной электростатического взаимодействия является неравномерное распределение заряда по взаимодействующим системам. Модели различных типов электростатических взаимодействий имеют наиболее простой вид, так как основаны на законе Кулона. Для хроматографии вполне достаточно рассмотреть ион-ионные, ион-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия. Все они с большим или меньшим успехом могут быть описаны притяжением и отталкиванием точечных зарядов.

Дальше уже сложнее — начинается «темный лес», вид которого очень зависит от того, какую модель выбрать для описания, а это, в свою очередь, зависит от того, до какой глубины нужно копать. Нам очень глубоко копать не надо. Нам нужна наглядная описательная модель, пусть даже весьма поверхностная, но позволяющая не запутаться конкретно в жидкостной хроматографии. Метод молекулярных орбиталей (МО) вполне может быть такой моделью.

Согласно модели МО каждому электрону, движущемуся в поле ядер, можно приписать определенную математическую функцию, квадрат которой равен вероятности его нахождения в пространстве. Эта функция называется орбиталью электрона; каждая орбиталь характеризуется определенным значением энергии, а также определенной формой. Строго говоря, орбиталь не соответствует какому-то определенному электрону, поскольку они неразличимы. Правильно было бы говорить, что системе из нескольких ядер и электронов соответствуют определенные орбитали.

По энергетике орбитали можно разделить на три типа: связывающие, несвязывающие и разрыхляющие. Несвязывающие орбитали (n -орбитали) не принимают большого участия в образовании химических связей внутри молекулярной системы. Связывающие орбитали с низкой энергией охватывают несколько ядер и способствуют увеличению устойчивости всей системы. В основном состоянии молекулярной системы электроны преимущественно находятся на связывающих и несвязывающих орбиталях.

В возбужденных состояниях электроны могут переходить на разрыхляющие орбитали, характеризующиеся более высокими энергиями. Глубина потенциального минимума этих электронных состояний значительно меньше, чем для связывающих состояний; в результате, даже при сравнительно невысокой колебательной энергии ядер молекулярная система с электронами на разрыхляющих орбиталях может диссоциировать (разрушиться).

По симметрии орбитали можно разделить на σ - и π -орбитали. Упрощая, σ -орбитали расположены преимущественно вдоль линий, соединяющих ядра, а π -орбитали — перпендикулярно им. Таким образом, π -орбитали являются наиболее делокализованными, то есть «размазанными» в пространстве, хотя некоторые n -орбитали и σ -орбитали также характеризуются значительной степенью делокализации.

Наиболее сильные химические связи образуются «внутри» молекулярной системы; на языке МО это означает, что наиболее низкой энергией обладают σ -орбитали, являющиеся преимущественно внутримолекулярными.

Межмолекулярное взаимодействие возникает, когда электроны молекулярных систем, находящиеся на значительно делокализованных орбиталях, могут «дотянуться» до свободных делокализованных орбиталей других молекулярных систем через разделяющее их минимально возможное расстояние, обусловленное отталкиванием несвязывающих электронов. Другими словами, электрон(ы) молекулы-донора могут двигаться в поле ядер обеих молекул, обеспечивая дополнительную устойчивость всей системы в целом, что в рамках химической доктрины и называют химической связью.

Разумеется, далеко не любые орбитали могут взаимодействовать. Опять же, упрощая, можно сказать, что для эффективного взаимодействия орбиталей необходимо соответствие их форм, и в особенности симметрий.

Описанный универсальный механизм образования химической связи принято называть *донорно-акцепторным механизмом*. Молекула-донор электронов называется *основанием Льюиса*, молекула-акцептор электронов — *кислотой Льюиса*. Основанием Льюиса может служить частица, обладающая лабильным электроном (или парой электронов) на π -орбитали (реже — σ -орбитали), n -орбитали или d -орбитали в случае атомов или атомных ионов переходных металлов. Кислотой Льюиса может служить частица, обладающая свободной π -орбиталью, σ -орбиталью, n -орбиталью или свободной d -орбиталью, опять же, в случае атомов или атомных ионов переходных металлов.

Частичный или полный переход электрона с орбитали донора на орбиталь акцептора принято называть *переходом с переносом заряда*, а образующиеся комплексы — *комплексами с переносом заряда*. В зависимости от

химической природы донора и акцептора комплексы с переносом заряда могут быть различных типов: π - π , π - d , n - d и т.д.

Согласно наиболее распространенной гипотезе, высказанной Малликоном в 50-х годах, энергия взаимодействия в комплексе с переносом заряда обратно пропорциональна разнице между энергиями высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) электрон-донора и низшей свободной молекулярной орбитали (НСМО) электрон-акцептора. Однако, как показывает практика (например, данные по скорости органических реакций, по константам устойчивости комплексов, по ВЭЖХ разделением в режиме с переносом заряда), это простое приближение работает далеко не всегда.

А.2.1. Дипольные взаимодействия

Диполь — это физическая модель, описывающая систему из двух разноименных, но равных по величине электрических зарядов на некотором расстоянии друг от друга.

Векторная величина, равная произведению вектора, соединяющего заряды, на величину электрического заряда, называется *дипольным моментом* μ и измеряется в дебаях, Д; 1 Д $\approx 3,34 \times 10^{-30}$ Кл·м.

Прямая линия, соединяющая заряды, называется осью диполя. Напряженность электрического поля в направлении оси диполя обратно пропорциональна кубу расстояния до диполя при условии, что расстояние значительно превышает его размеры.

Многие несимметричные молекулы обладают *постоянным дипольным моментом*. Постоянный дипольный момент обусловлен неравномерным распределением заряда на молекуле и в основном присущ соединениям с электроотрицательными заместителями в их структуре: галогенами -F, -Cl, -Br, функциональными группами, содержащими кислород, азот -OR, -NR₂, -NO₂, -CN, -COOR, =C(O), -NHC(O)- и т.д. Постоянный дипольный момент не изменяется во внешнем электрическом поле или электрическом поле соседних молекул, являясь постоянной характеристикой молекулы.

Под влиянием внешнего электрического поля молекула может получить дополнительный, *наведенный* или *индуцированный дипольный момент*, если ее структура включает легко поляризуемый фрагмент. Значительной поляризуемостью обладают системы с кратными, в том числе сопряженными, связями, ароматические системы -Ar, а также группы, содержащие атомы с большим ионным радиусом, к примеру -SR, -I.

В результате поляризации молекулы в электрическом поле происходит смещение заряда в молекуле, что является причиной появления наведенного дипольного момента. Наведенным моментом могут обладать

соединения, не имеющие постоянного дипольного момента, но содержащие в своей структуре поляризуемые фрагменты. Дополнительный дипольный момент может также индуцироваться и на молекулах соединений с постоянным дипольным моментом; в этом случае результирующий дипольный момент зависит от угла между двумя диполями, то есть наведенный дипольный момент может как увеличивать, так и уменьшать постоянный дипольный момент.

В отсутствии внешнего электрического поля на данную молекулу действует электрическое поле соседних молекул. Напряженность электрического поля, действующего на молекулу, отлична от нуля, если она обладает несимметричным полярным окружением.

Коэффициент пропорциональности между величиной индуцированного дипольного момента и напряженностью электрического поля называется *поляризуемостью* молекулы:

$$\mu_{\text{инд}} = \alpha \times E,$$

где $\mu_{\text{инд}}$ — индуцированный (наведенный) диполь, α — поляризуемость молекулы, E — напряженность электрического поля.

Диполь-дипольным взаимодействием называется взаимодействие диполей, приводящее к их взаимной ориентации и притяжению. Энергия взаимодействия двух диполей пропорциональна произведению их дипольных моментов.

В жидкостной хроматографии, как правило, рассматривается взаимодействие дипольного момента адсорбата с дипольными моментами полярных групп адсорбента; таким образом, диполь-дипольное взаимодействие является одной из причин удерживания молекул, обладающих дипольным моментом, на полярных неподвижных фазах в неполярных средах.

Наиболее характерный случай диполь-дипольного взаимодействия в жидкостной хроматографии соответствует ситуации, когда поверхность полярной неподвижной фазы модифицирована адсорбционным слоем полярного компонента подвижной фазы. Для этого случая моделью однородно модифицированной поверхности неподвижной фазы является эквипотенциальная поверхность, характеризующаяся некоторым усредненным значением напряженности электрического поля. Энергия взаимодействия диполя адсорбата с электрическим полем неподвижной фазы равна произведению дипольного момента на напряженность электрического поля:

$$U = -\mu \times E.$$

Напряженность электрического поля полярной адсорбционно модифицированной неподвижной фазы составляет величину порядка 10^9 В/м, а энергия «диполь-полевого» взаимодействия — порядка кДж/моль.

А.2.2. Водородная связь

Водородная связь возникает между двумя молекулами, одна из которых имеет лабильный, подвижный атом водорода в составе какой-либо ее функциональной группы: $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NHC}(\text{O})$, $-\text{NH}_2$, а другая молекула содержит в своей структуре атом электроотрицательного элемента: кислорода $-\text{O}-$, $=\text{O}$, азота $=\text{N}-$, или галогена $-\text{F}$, $-\text{Cl}$. На схеме образования водородной связи $-\text{X}-\text{H}\cdots\text{A}-$ молекула-донор протона (ядра атома водорода) обозначается как $-\text{X}-\text{H}$, а электроотрицательный атом молекулы-акцептора протона $\text{A}-$; водородная связь обозначается пунктирной линией.

Водородная связь по отдельности одинаково плохо описывается и электростатическими моделями, и методом МО. Поэтому, в принципе, можно попытаться их скомбинировать.

Рассуждая таким образом, комплекс с водородной связью можно рассматривать как комплекс с переносом заряда, в котором несвязывающая n -орбиталь с высокой энергией (в учебниках ее называют «электронной парой») или связывающая π -орбиталь A взаимодействует с вакантной σ -орбиталью $-\text{X}-\text{H}$, локализованной преимущественно у водорода. В типичных комплексах с переносом заряда изменение межатомных расстояний невелико, однако протон является очень подвижным ядром, и в комплексе с водородной связью его положение значительно (от процентов до десятков процентов по сравнению с длиной связи $\text{X}-\text{H}$) изменяется. В свою очередь, сдвиг протона приводит к увеличению дипольного момента $-\text{X}-\text{H}$, что обуславливает дополнительное электростатическое взаимодействие внутри комплекса.

Классификация водородных связей основана на различии в их энергии. Сравнительно слабые водородные связи: $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{}$, $-\text{NH}_2\cdots\text{N}$, $-\text{OH}\cdots\text{Ag}$ имеют энергию порядка кДж/моль, более сильные $-\text{OH}\cdots\text{O}=\text{}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}\cdots\text{O}=\text{}$ около 10–25 кДж/моль. Энергия водородных связей $-\text{COOH}\cdots\text{N}$, $-\text{COOH}\cdots\text{O}=\text{}$ может превышать 20 кДж/моль. Структура молекулярного комплекса с водородной связью также определяется ее энергией. Увеличение взаимодействия сказывается на деформации связи $\text{X}-\text{H}$, которая становится длиннее, в отличие от самой водородной связи $\text{H}\cdots\text{A}$, которая становится короче.

В случае слабой водородной связи ковалентные связи молекулы-донора и молекулы-акцептора протона практически не деформируются; молекулярный комплекс лабилен и обладает очень коротким временем жизни.

Средняя энергия взаимодействия $-\text{X}-\text{H}\cdots\text{A}-$ порядка 10–25 кДж/моль соответствует случаю образования «классической» водородной связи во

многих протонных растворителях и их смесях. При образовании таких молекулярных комплексов связь $\text{X}-\text{H}$ может в различной степени деформироваться.

Водородная связь с высокой, более 25–30 кДж/моль, энергией приводит к образованию достаточно стабильного молекулярного комплекса, строение которого отличается от строения исходных молекул донора и акцептора протона. В этом случае образование водородной связи можно считать кислотно-основной реакцией, которая происходит в согласии с теорией Бренстеда. Молекулярный комплекс молекулы-донора и молекулы-акцептора является комплексом с частичным переносом протона и называется *ионной парой*. Строение ионной пары может выражаться схемой $-\text{X}\cdots\text{H}\cdots\text{A}-$, или $-\text{X}^-\cdots\text{H}^+\text{A}-$, отражающей преимущественную локализацию протона около молекулы-акцептора.

Свидетельством образования ионной пары является высокое значение *инкремента дипольного момента молекулярного комплекса*, равное векторной разнице между дипольным моментом комплекса и суммой дипольных моментов его компонентов. Зависимость инкремента дипольного момента от энергии водородной связи выражается S-образной кривой с интенсивным подъемом в интервале 30–60 кДж/моль с соответствующим увеличением инкремента дипольного момента комплекса приблизительно от 1 до 6–7 Д; последний случай, к примеру, соответствует образованию комплексов фенолов с алкиламинами в гексане. Комплексы более сильных кислот с сильными основаниями являются ионными парами; инкремент дипольного момента пары имеет значение более 5–7 Д, а энергия водородной связи — более 50–60 кДж/моль.

Ионные пары могут существовать лишь в среде с низкой диэлектрической проницаемостью. В средах с высоким показателем диэлектрической проницаемости, в полярных растворителях и водных системах они частично или полностью диссоциируют на ионы, для описания взаимодействия которых применяется теория электростатических ион-ионных взаимодействий.

Водородная связь может быть по праву названа одним из самых распространенных типов взаимодействий в жидкостных системах, включающих протонные растворители как компоненты; в частности, такие системы часто применяются как подвижные фазы в жидкостной хроматографии.

В хроматографической системе водородная связь может образовываться напрямую между молекулой адсорбата и функциональными группами полярной неподвижной фазы и, таким образом, приводить к удерживанию. С другой стороны, случаи непосредственного взаимодействия ад-

сорбата с неподвижной фазой посредством водородной связи встречаются в жидкостной хроматографии довольно редко.

В основном это связано с тем, что в обычно применяемых условиях хроматографирования поверхность полярной неподвижной фазы уже покрыта адсорбционным слоем полярного компонента подвижной фазы, или, другими словами, *адсорбционно модифицирована*. Деактивированная адсорбционным слоем неподвижная фаза в гораздо меньшей степени склонна к взаимодействию с адсорбатами за счет сильных водородных связей; удерживание же в этом случае может осуществляться, к примеру, за счет диполь-полевого взаимодействия.

Непосредственное взаимодействие адсорбатов с неподвижной фазой за счет водородных связей встречается в хиральной и аффинной хроматографии. В хиральной хроматографии эффективная дискриминация энантиомеров происходит только при близком контакте неподвижной фазы и адсорбата. В результате контакта должно обеспечиваться «трехточечное» взаимодействие, нередко именно путем образования сильных водородных связей или за счет координационных взаимодействий в лигандообменной хроматографии.

В аффинной хроматографии биокomплементарность адсорбата (антигена) и лиганда (антитела) на поверхности неподвижной фазы также способна проявляться лишь при тесном контакте последних, а основным типом взаимодействия «антиген-антитело» является опять же водородная связь. Как следствие, в хиральной, и особенно аффинной хроматографии, адсорбаты нередко элюируются в виде уширенных асимметричных хроматографических пиков.

Водородные связи играют значительную роль в сольватировании полярных адсорбатов в неполярных средах; в результате взаимодействия адсорбатов с полярными компонентами элюента образуются *сольватные комплексы* адсорбатов. Во многих случаях изменения в удерживании адсорбатов при варьировании доли протонного растворителя в подвижной фазе связаны с перестройкой их сольватных комплексов и, таким образом, с изменением их адсорбционных свойств. Как правило, при сольватации происходит гашение дипольного момента адсорбата за счет антипараллельной ориентации диполей адсорбата и молекул полярного компонента подвижной фазы. Исключение составляют случаи образования ионных пар между адсорбатом и компонентом подвижной фазы, а также случаи, когда адсорбат содержит внутримолекулярную водородную связь, при размыкании которой за счет водородных связей с растворителем происходит увеличение дипольного момента сольватного комплекса.

А.2.3. Модель выталкивания из структурированной среды

Водородные связи являются основной причиной высокой структурированности протонных растворителей, и в особенности воды.

Вода вообще обладает очень необычным свойством — протонным обменом, который происходит «по сетке» водородных связей. Быстрый протонный обмен в воде и даже в водно-органических системах приводит к образованию своего рода единого жидкого кристалла фазы, к которому вряд ли вообще применимо понятие молекулы (в масштабе времени, большим характеристического времени протонного обмена, то есть 10^{-3} с при рН 7). Структурированность систем протонных растворителей, и особенно водных систем, также приводит к значительному дальнему воздействию взаимодействий в их среде.

Помещение в такую среду частицы большого объема приводит к искажению или нарушению структуры среды. Этот процесс является энергетически невыгодным, особенно для неполярных, плохо взаимодействующих со средой частиц, не способных в достаточной мере компенсировать рост энергии системы. Выталкивание такой частицы из среды приводит к уменьшению площади контакта с ней, то есть является процессом энергетически выгодным, уменьшающим энергию системы.

Грубую оценку выталкивающей способности жидкой среды можно провести по ее поверхностному натяжению, которая в энергетической интерпретации соответствует свободной поверхностной энергии.

А.2.4. Ионные взаимодействия

Взаимодействие двух разноименных атомных ионов можно описать кулоновским притяжением двух сфер с некоторым пространственным распределением заряда внутри них. В грубом приближении, способность любого иона к электростатическим взаимодействиям можно выразить через величину отношения заряда к квадрату его некоторого «эффективного» радиуса. Такая величина называется *поверхностной плотностью заряда* иона.

Величина *эффективного радиуса* включает также сольватную оболочку иона. Поэтому эффективный радиус иона неодинаков в разных растворителях. Для несольватированного иона можно встретить термин *истинный радиус иона*, то есть под истинностью подразумевается именно отсутствие сольватной оболочки.

Ион-дипольное взаимодействие иона с молекулами растворителя приводит к интересному и даже на первый взгляд парадоксальному эффекту. Ионы (одинакового заряда) с меньшим истинным радиусом обладают большим эффективным радиусом. В биполярных растворителях это спра-

ведливо и для катионов, и для анионов. Причина заключается в том, что ионы с небольшим истинным радиусом имеют большую поверхностную плотность заряда и, таким образом, лучше сольватируются растворителем.

Такие биполярные растворители, как вода эффективно сольватируют и катионы, и анионы. Некоторые апротонные растворители, к примеру, диметилсульфоксид, эффективно сольватируют катионы, но плохо сольватируют анионы. В таких растворителях эффективный радиус анионов может приближаться к их истинному радиусу.

Сходное явление можно наблюдать для смесей растворителей: эффект предпочтительной сольватации катиона одним растворителем, а аниона другим называется *гетероселективной сольватацией*. Различным образом сольватированные ионы называются *сольватомерами*.

Таким образом, путем регулирования состава среды можно регулировать размер сольватированных ионов и величину ионного взаимодействия.

А.2.5. Дисперсионные взаимодействия

Если химика попросить привести пример проявления дисперсионных взаимодействий, что он вспомнит прежде всего? Что алифатические углеводороды способны взаимодействовать фактически только за счет дисперсионных взаимодействий. Что в основном дисперсионными взаимодействиями обусловлены такие явления, как конденсация и затвердевание углеводородов, понижение межфазного поверхностного натяжения жидкостей (в том числе воды) при контакте с углеводородной фазой, адсорбция паров углеводородов на неполярных фазах в газовой хроматографии.

Вообще, термин *дисперсионные взаимодействия* относится к категории исторически сложившихся, причем в разных научных дисциплинах в него вкладывается различный смысл. Не вдаваясь в ненужные подробности, просто выясним, какой смысл в него вкладывается конкретно в хроматографии.

Дисперсионными взаимодействиями в хроматографии принято обозначать взаимодействия адсорбатов с неполярными алифатическими структурными фрагментами адсорбента.

Если рассуждать таким образом, то в терминах МО дисперсионными взаимодействиями можно будет назвать взаимодействия различных химических частиц в результате частичного перекрытия их σ -орбиталей. Почему именно сигма? Потому что σ -орбитали есть у всех молекул! Ведь дисперсионные взаимодействия наиболее универсальны. Их также называют «неспецифическими» (хотя мне этот термин не очень нравится). Чем сильнее делокализованы σ -орбитали взаимодействующих химических частиц, чем выше их поляризуемость — тем сильнее дисперсионные взаимодействия.

А.2.6. Взаимодействия с переносом заряда (π -взаимодействия)

Идеальным объектом описания с помощью метода МО являются *взаимодействия с переносом заряда* (charge-transfer). Они характерны прежде всего для таких пар взаимодействующих химических частиц, в которых по крайней мере одна из частиц обладает делокализованной π -орбиталью. Такая частица является донором электрона, если предоставляет комплексу свой электрон с высшей занятой молекулярной орбиталью (ВЗМО), или акцептором, если предоставляет низшую свободную молекулярную орбиталь (НСМО).

В дальнейшем вместо «взаимодействия с переносом заряда» (термина немного длинного и более широкого по смыслу) будем говорить более конкретно: *π -взаимодействия*.

В зависимости от химической природы второй взаимодействующей частицы в паре π -взаимодействия можно также разделить на несколько типов. Хорошо изучены π - π взаимодействия (для комплексов ненасыщенных органических молекул между собой) и π - d взаимодействия (для комплексов ненасыщенных органических молекул с атомными ионами и атомами переходных металлов); π - n взаимодействия π -электронных систем с n -орбиталями высоких энергий («неподеленными электронными парами») исследованы в значительно меньшей степени.

π -взаимодействия могут быть как слабыми, так и очень сильными. Сравнительно слабыми межмолекулярными π - π взаимодействиями обусловлена высокая температура плавления бензола, сильными — связывание в комплексах пикриновой кислоты с ароматическими соединениями, очень сильными внутримолекулярными π - d взаимодействиями — связывание внутри молекулы ферроцена.

В хроматографии взаимодействия π - π типа реализуются при удерживании ненасыщенных адсорбатов на адсорбентах, в структуру которых входят фрагменты с ненасыщенными электрон-донорными/акцепторными системами (режим с переносом заряда).

Взаимодействия π - d типа реализуются при удерживании ненасыщенных адсорбатов на адсорбентах с иммобилизованными (закрепленными) ионами или комплексами переходных металлов. Хотя бывают и обратные случаи, когда адсорбенты с ненасыщенными фрагментами применяются для разделения ионов и комплексов переходных металлов. Взаимодействия π - d типа наиболее сильно выражены для углеводородов с двойными или тройными связями; из переходных металлов сильнее всего взаимодействуют серебро и ртуть.

А.2.7. Координационные взаимодействия

Термина «координационные взаимодействия» в жидкостной хроматографии не существует; однако для удобства пришлось позаимствовать его из координационной химии (правда, там он выглядит как «координационная связь»). Цель — одним словом определить взаимодействия, приводящие к образованию комплексов ионов металлов (как правило, переходных) с различными лигандами.

Под координационными взаимодействиями будем понимать сочетание ионных взаимодействий и взаимодействий с переносом заряда $n-d$ типа (то есть между d -орбиталями переходных металлов и n -орбиталями, «неподеленными электронными парами» органических лигандов). Например, комплексы ЭДТА с Ca^{2+} или оксина (8-гидроксихинолина) с Fe^{3+} по этой логике образуются за счет координационных взаимодействий.

Опять же с целью удобства договоримся относить взаимодействия с переносом заряда $\pi-d$ типа не к координационным, а к π -взаимодействиям. То есть будем считать, что комплексы триглицеридов ненасыщенных кислот с Ag^+ образуются за счет π -взаимодействий.

А.3. Типы удерживания в жидкостной хроматографии

«Тут в плане выяснения механизмов сорбции важно помнить, что обычно наука не делается ради науки. Знание механизма, хотя бы в первом приближении, ценно в плане практики тем, что позволяет целенаправленно делать какие-то телодвижения по улучшению разделения, формы и асимметричности пика, экспрессности анализа. А в некоторых случаях позволяет и предсказать (пусть даже не на 100%) результат эксперимента, а значит — экономить силы, время и средства за счет исключения необходимости проведения заведомо бесперспективных экспериментов, а также бессистемного варьирования состава элюента в надежде методом «научного тыка» найти оптимальный вариант разделения. Далее, важно видеть за всей цифровой эквилибристикой физический смысл получающихся зависимостей и границы применимости предлагаемых моделей».

(Л. Сапрыкин. Аналитический форум. www.anchem.ru)

«Мы обнаружили, что всякое состояние в мире может быть представлено в виде суперпозиции (линейной комбинации с подходящими коэффициентами) базисных состояний. Вы вправе спросить, во-первых: каких именно базисных состояний? Что ж, возможностей тут немало... Затем можно спросить: с какими коэффициентами их брать? А это уж зависит от физических обстоятельств. Различные совокупности коэффициентов отвечают различным физическим условиям. Здесь важно знать одну вещь — пространство, в котором вы работаете, иными словами, знать, что эти базисные состояния означают физически».

(Ричард Фейнман. Фейнмановские лекции по физике)

Приведенные типы межмолекулярных взаимодействий можно рассматривать как своего рода «базис», язык для описания свойств хроматографической системы. С этой точки зрения любую хроматографическую систему, наверное, можно было бы описать путем суперпозиции типов физико-химических взаимодействий, взятых с какими-либо коэффициентами. На поверку, однако, оказывается, что моделирование на этом уровне обречено на неудачу, если речь идет не об одной-двух наиболее «простых» хроматографических системах, а о десяти или ста системах, причем достаточно «сложных».

Основная причина сложности моделирования на уровне типов взаимодействий заключается в том, что, во-первых, физические модели этих взаимодействий являются слишком простыми фактически и слишком сложными расчетно; во-вторых, проверка этих моделей, как правило, осуществляется на наиболее «простых» системах, специально подобранных для этих целей. На практике же «простые» системы встречаются редко; в большинстве хроматографических систем удерживание и селективность определяются целым комплексом межмолекулярных взаимодействий, которые нельзя разделить на составляющие их типы ни экспериментально, ни умозрительно и тем более нельзя определить загадочные «коэффициенты». Таким образом, описание свойств хроматографических систем на языке типов межмолекулярных взаимодействий является недостаточно удобным и практичным.

Идея выхода из трудной ситуации следует из наблюдения, что различные типы межмолекулярных взаимодействий наиболее часто встречаются в хроматографических системах лишь в определенных сочетаниях, а в каких-то сочетаниях не встречаются совсем. Более того, приемлемых сочетаний такого рода существует на практике весьма ограниченное количество.

Назовем модель некоторого «часто встречающегося» в хроматографических системах сочетания типов межмолекулярных взаимодействий термином «тип удерживания». Это будет являться не точным определением, а первым приближением.

Следующий важный вопрос, на который следует исчерпывающе ответить, звучит так: «Что же определенный таким образом тип удерживания будет означать на практике?»

Допустим, проведено хроматографирование некоторого (довольно представительного) набора адсорбатов на одной неподвижной фазе, но при использовании различных подвижных фаз. Пусть, в результате, наблюдается, что, несмотря на различную элюирующую силу (соответственно, различное удерживание), все примененные подвижные фазы обеспечивают неизменную селективность системы по отношению к выбранной группе адсорбатов.

Этот факт, прежде всего, свидетельствует о том, что в разных хроматографических системах удерживание адсорбатов обусловлено однотипными физико-химическими взаимодействиями, величина которых изменилась (поскольку изменилось удерживание), но для всех адсорбатов пропорционально (ведь селективность осталась неизменной).

Сделаем второе, и последнее, допущение: что факторы удерживания адсорбатов изменяются в ряду, хорошо соответствующем какому-либо их физико-химическому свойству, определенному независимо или рассчитанному не из хроматографических данных. Этот факт может свидетельствовать о том, что один из типов межмолекулярных взаимодействий является в этом случае доминирующим.

В жидкостной хроматографии существуют всего несколько видов систем, отвечающих двум указанным выше условиям в достаточно широких рамках изменения химии неподвижной фазы и состава подвижной фазы.

Назовем такие хроматографические системы базовыми. Все дальнейшее изложение будет построено исходя из следующего утверждения: тип удерживания — это модель удерживания в базовой хроматографической системе. Это второе, более точное, определение типа удерживания, уже сочетающее в себе теорию жидкостной хроматографии с ее практикой.

Согласно этому определению понятие типа удерживания, с одной стороны, привязывается к характерному порядку элюирования, селективности, свойственной определенным типам хроматографических систем. С другой стороны, тип удерживания — это также определенное сочетание различных межмолекулярных взаимодействий.

Значительно удобнее говорить о жидкостной хроматографии на языке типов удерживания, чем на языке типов взаимодействий. Особо следует отметить, что, как будет показано далее, тип удерживания является четко

определяемой экспериментально, количественной характеристикой хроматографической системы.

Если попытаться определить тип удерживания в одном предложении, то получится примерно такое определение: «Тип удерживания — это модель хроматографической системы с определенной селективностью, в которой реализуется определенный комплекс физико-химических взаимодействий; наличие более чем одной линейно независимой тенденции изменения селективности системы является признаком реализации нескольких типов удерживания».

Механизм удерживания, таким образом, будет являться сочетанием типов удерживания для каждой конкретной системы. Принципиальное различие от сочетания видов взаимодействий состоит в том, что величины вкладов различных типов в общий механизм можно определить количественно (см. разд. А.3.2).

А.3.1. Логическая связь между типом удерживания и видом хроматографии

Постулируем следующие типы удерживания: нормально-фазовый, обращенно-фазовый, ионообменный, лигандообменный, с переносом заряда, эксклюзионный. Краткая характеристика каждого из типов удерживания приведена в табл. А.1.

Таблица А.1. Типы удерживания

Тип удерживания	Тип ф/х взаимодействий	Соотносимые с типом удерживания ф/х свойства адсорбатов	Базовые хроматографические системы
Обращенно-фазовый	Дисперсионные + + выталкивание из водной среды	Коэффициенты распределения в системе «октанол-вода»	НФ: С18 модифицированный силикагель, ПФ: ацетонитрил-вода, адсорбаты: гомологи бензола
Нормально-фазовый	Дипольные (диполь-полевой) + + водородные связи	Дипольные моменты	НФ: силикагель, ПФ: гексан-диоксан-уксусная кислота, адсорбаты: бензойные кислоты
Нормально-фазовый для гидрофильного режима	Водородные связи	?	НФ: NH ₂ модифицированный силикагель, ПФ: ацетонитрил-вода, адсорбаты: моносахара

Таблица А.1 (окончание)

Тип удерживания	Тип ф/х взаимодействий	Соотносимые с типом удерживания ф/х свойства адсорбатов	Базовые хроматографические системы
Ионообменный	Ионные	Рассчитанные из экспериментов эффективные радиусы	НФ: «сильная» ионообменная фаза низкой емкости, ПФ: водный буфер, адсорбаты: однозарядные неорганические ионы
Лигандообменный	Координационные	Константы стабильности координационных соединений	НФ: комплексообразующий сорбент, ПФ: водно-органические смеси, адсорбаты: комплексообразующие соединения
С переносом заряда	π -взаимодействия	Константа стабильности π -комплексов	НФ: пиренил-модифицированный силикагель, ПФ: гексан-хлороформ, адсорбаты: ПАУ
Эксклюзионный	—	Рассчитанные из экспериментов эффективные размеры	НФ: крупнопористый силикагель, ПФ: хлороформ, аналиты: стандарты полистирола

Из таблицы видно, что определенному типу удерживания можно поставить в соответствие базовую хроматографическую систему, в которой бы он встречался в наиболее чистом виде. В такой базовой системе порядок элюирования (селективность разделения) будет сравнительно нечувствителен к изменению условий хроматографирования. Таким образом, селективность разделения определенного набора адсорбатов можно использовать как критерий для определения доминирования того или иного типа удерживания в произвольной хроматографической системе.

Терминами «вид хроматографии» или «режим хроматографии» будем обозначать все хроматографические системы, в которых доминирует определенный тип удерживания (см. табл. А.2).

В некоторых случаях, когда вклады двух или более типов становятся приблизительно равными, появляются трудности в отнесении режима хроматографирования. Иногда такие режимы называют смешанными (mixed).

Таблица А.2. Виды жидкостной хроматографии

Вид хроматографии	Типы удерживания, основной (возможные дополнительные)	Профиль градиента ПФ
Нормально-фазовая	Нормально-фазовый (с переносом заряда)	—
Гидрофильная	Нормально-фазовый (ионообменный)	Увеличение доли воды в системе органический растворитель-водный буфер
Обращенно-фазовая	Обращенно-фазовый (нормально-фазовый, ионообменный)	Увеличение доли органического растворителя в системе органический растворитель-водный буфер
Гидрофобная	Обращенно-фазовый	Уменьшение ионной силы в системе органический растворитель-водный буфер
Ионная	Ионообменный (обращенно-фазовый, лигандообменный)	Увеличение ионной силы водного буфера, изменение рН водного буфера
Лигандообменная	Лигандообменный (ионообменный, эксклюзионный)	Увеличение концентрации добавки — лиганда, уменьшающего удерживание. Увеличение ионной силы водного буфера, изменение рН водного буфера
С переносом заряда	С переносом заряда (нормально-фазовый)	Увеличение доли органического растворителя, способного к π -взаимодействию
Эксклюзионная	Эксклюзионный (различные адсорбционные)	

Таким образом, нельзя формально утверждать, что какая-либо хроматографическая система является нормально-фазовой, обращенно-фазовой и т.д. лишь на основе марки адсорбента и состава подвижной фазы. Каждая система характеризуется определенным типом или типами удерживания, вклад которых в механизм удерживания зависит не только от параметров хроматографической системы, но также и от выбора адсорбатов.

А.3.2. Расчет количественных характеристик типов удерживания (дескрипторов удерживания) при помощи метода факторного анализа

Факторный анализ является статистическим методом обработки экспериментальных данных. Этот метод позволяет обобщить результаты эксперимента, то есть уменьшить количество исходных экспериментальных данных без потери информативности описания изучаемой системы. Факторный анализ применяется в том случае, когда наблюдаемые параметры исследуемой системы коррелируют между собой, то есть в большей или меньшей степени описывают одну и ту же тенденцию.

Основное предположение, обосновывающее применение факторного анализа в хроматографии, состоит в том, что корреляция наблюдаемых параметров удерживания в исследуемой хроматографической системе (например, $\log k'$) является признаком того, что они описывают некоторое меньшее число тенденций изменения селективности хроматографической системы. Число таких тенденций должно быть меньше, чем число наблюдаемых параметров, по определению — это основное условие применимости факторного анализа.

Эти тенденции, по сути, и являются типами удерживания. Факторный анализ позволяет выделить из экспериментальных данных численные характеристики, факторы, которые в данном случае являются количественными характеристиками типов удерживания. Назовем их дескрипторами удерживания.

Таким образом, эксперимент по исследованию механизма удерживания в конечном итоге сводится к выделению из экспериментальных данных численных факторов и их интерпретации как дескрипторов удерживания. Но основой такого исследования является, прежде всего, грамотно поставленный эксперимент. Правильный выбор серии подвижных (или неподвижных) фаз, представительная выборка сорбатов, умение извлекать максимум информации при корреляционном анализе — все это будет оказывать значительное влияние на конечные результаты исследования.

Вначале — небольшой экскурс в сам метод. С математической точки зрения задача нахождения факторов сводится к задаче нахождения собственных векторов матрицы корреляции исходной матрицы экспериментальных данных. Собственные векторы пропорциональны факторам, а собственные значения пропорциональны вкладам факторов в описание исходных данных.

Давайте рассмотрим ситуацию: исходные экспериментальные данные представляют собой матрицу (таблицу) размерности $m \times n$, где m — число строк (объектов), n — число столбцов (параметров). Параметры можно

представить как n векторов в m -мерном пространстве объектов. Взаимозависимость двух параметров (их «похожесть») выражается коэффициентом корреляции, который геометрически можно представить как косинус угла между векторами-параметрами. Таким образом, несколько сильно коррелированных параметров выглядят в пространстве объектов как пучок векторов.

Метод факторного анализа позволяет выделить наименьшее количество r некоторых новых линейно независимых параметров, которые могут описать систему практически так же хорошо, как и n экспериментальных параметров. Эти линейно независимые параметры, полученные из экспериментальных данных расчетным путем, называются факторами. Факторы можно представить как ортогональный базис (прямоугольную систему координат), по которому можно каждый экспериментальный параметр разложить на r составляющих. Геометрически коэффициенты такого разложения соответствуют проекциям параметров-векторов на оси-факторы и называются факторными нагрузками (factor loadings). Матрица факторных нагрузок представляет собой таблицу размерности $r \times n$.

В пространстве объектов полученные факторы выглядят как m -мерные векторы. Матрица размерности $m \times r$, состоящая из проекций факторов на оси объектов, и называется, собственно, матрицей факторов (factor scores).

Таким образом, исходная матрица экспериментальных данных может быть представлена в виде произведения матрицы факторов на матрицу факторных нагрузок.

Математическая процедура нахождения факторов состоит из нескольких этапов. На первом этапе исходная матрица $Y = (y_{ij})$ нормируется по правилу $z_{ij} = (y_{ij} - y_i^{av})/s_i$, где y_i^{av} — среднее по столбцам, s_i — среднеквадратическое отклонение по столбцам и, таким образом, преобразуется в стандартную матрицу $Z = (z_{ij})$. На втором этапе из матрицы $Z = (z_{ij})$ вычисляется матрица корреляции R размерности $n \times n$, состоящая из коэффициентов корреляции экспериментальных параметров между собой. На третьем этапе находятся собственные векторы матрицы корреляции R , удовлетворяющие уравнению $R\alpha = \lambda\alpha$, где λ — собственные значения матрицы корреляции, α — искомые собственные векторы. Факторные нагрузки пропорциональны собственным векторам матрицы корреляции: $a_{ij} = \alpha_{ij} (\lambda_i / (\alpha_{i1}^2 + \alpha_{i2}^2 + \dots + \alpha_{im}^2))^{1/2}$, а вклады факторов пропорциональны собственным значениям. Далее, из матрицы факторных нагрузок может быть вычислена и матрица факторов P , поскольку, как уже было сказано, исходная матрица есть произведение матрицы факторов на матрицу факторных нагрузок $z_{ij} = a_{1j}p_{1i} + a_{2j}p_{2i} + \dots + a_{rj}p_{ri}$, или $Z = AP$.

Метод факторного анализа реализован во многих статистических программных пакетах, к примеру, STATISTICA 5.0 (StatSoft).

Теперь расскажем о методике исследования механизмов удерживания. Она состоит из трех этапов.

1. На первом этапе проводят измерение величин удерживания в ряде исследуемых систем для представительной выборки адсорбатов.

При проведении эксперимента можно варьировать как состав подвижной фазы, так и неподвижные фазы. Однако, при этом следует помнить, что чем больше разнородных систем входит в эксперимент, тем все большее число факторов будет выделено в результате — соответственно, тем сложнее окажется интерпретация или менее очевидны закономерности. Шансы успешно интерпретировать результаты повышаются, если в эксперимент включаются довольно схожие системы (к примеру, варьируется лишь состав подвижной фазы при неизменной неподвижной).

В качестве экспериментально определяемой величины удобно применять логарифм фактора удерживания $\lg K'$, который является безразмерной величиной, пропорциональной энергии адсорбции.

2. На втором этапе производят статистическую обработку данных.

Для этого сначала экспериментальные данные сводятся в таблицу (матрицу): параметры (столбцы) должны соответствовать различным хроматографическим системам, а объекты (строки) — различным адсорбатам. Затем полученная матрица обчисляется с помощью программы факторного анализа.

Результатами обработки являются: вклады факторов, факторы и факторные нагрузки. Необходимо выбрать минимальное количество факторов, которые в сумме достаточно полно описывают исходную матрицу данных (например, на 99%).

3. Третий этап состоит в интерпретации полученных данных.

Основным инструментом при интерпретации данных является корреляционный анализ. Полученные факторы можно пытаться коррелировать с селективностью базовых систем, с различными физико-химическими свойствами. Шансы на успех значительно возрастают, если уже до проведения исследования была сформулирована некоторая гипотеза и эксперимент лишь должен ее подтвердить или опровергнуть.

Но такой эксперимент можно ставить и «вслепую», надеясь прояснить ситуацию, и уже дальше формулировать гипотезу. Таким образом, факторный анализ может применяться как для проверки готовых гипотез, так и для выдвижения новых.

Достаточно простой задачей для факторного анализа является отслеживание динамики изменения вкладов различных типов удерживания в механизм удерживания при варьировании состава элюента. Динамику можно проследить, к примеру, следующим образом:

- 1) получить $\ln K'$ для десяти составов элюента (то есть десяти параметров), занести их в таблицу в порядке изменения концентрации одного из компонентов;
- 2) составить из десяти параметров шесть матриц по пять параметров, на каждом шаге исключая по одному параметру «слева» и добавляя один параметр «справа»;
- 3) с помощью факторного анализа получить шесть значений вклада определенного типа удерживания и отложить их на графике на оси x ; на оси y отложить шесть значений концентрации выбранного компонента элюента «в середине» матрицы; по полученным точкам построить график.

Несколько рекомендаций...

1. Помните, что факторный анализ может применяться только в том случае, когда исследуемая система переопределена наблюдаемыми параметрами, то есть когда в исходной матрице заведомо содержится избыток информации о системе. При недостатке информации количество факторов всегда равно числу параметров, то есть применение факторного анализа не дает никакого результата.
2. Понятие «исследуемой системы» всегда определяется самим исследователем — так же, как и выбор наблюдаемых характеристик системы и объектов наблюдения.
3. Факторный анализ не может дать информации о системе больше, чем изначально заложено в матрице экспериментальных данных. По этой причине эксперимент необходимо планировать таким образом, чтобы при минимуме затрат он обеспечивал максимум информации об исследуемой системе.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ХИРАЛЬНАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Хиральная жидкостная хроматография (chiral LC) применяется для количественного анализа и препаративного выделения зеркальных изомеров (энантиомеров) оптически активных органических соединений.

Поскольку энантиомеры биологически активных веществ обладают различным действием на организм, хиральная хроматография наиболее часто применяется для анализа фармацевтических препаратов и полупродуктов их синтеза. Другой областью ее применения является органическая химия хиральных соединений.

Б.1. Основные типы хиральных неподвижных фаз

Неподвижные фазы для хиральной ВЭЖХ можно классифицировать по типу хирального селектора (см. табл. Б.1).

Таблица Б.1. Классификация хиральных селекторов неподвижных фаз

Источник	Тип селектора	Хиральный селектор
Натуральные	Протеины	Альбумины
		Гликопротеины
		Энзимы
	Олигосахариды	α -Циклодекстрин
		β -Циклодекстрин
		γ -Циклодекстрин
	Антибиотики	Ванкомицин
		Тейкопланин
		Ристоцетин
	Алкалоиды	Хинин
		Хинидин

Таблица Б.1 (окончание)

Источник	Тип селектора	Хиральный селектор
Полусинтетические	Модифицированные олигосахариды	Дериватизированные циклодекстрины
	Модифицированные полисахариды	Карбаматы полисахаридов
		Сложные эфиры полисахаридов
	Модифицированные низкомолекулярные природные соединения	Ионообменные селекторы
Синтетические		Производные пролина и других аминокислот (лигандообменные селекторы)
	Низкомолекулярные синтетические соединения	Пиркловские фазы (фазы браш-типа)
	Синтетические полимеры	Сшитые тартрамиды
		Полиакрилаты и полиакриламиды
		Импринтные материалы

С практической же точки зрения наиболее удобно рассматривать их с позиции частоты применения.

Безусловно, наиболее универсальными и широко применяющимися являются фазы с хиральными селекторами на основе модифицированных полисахаридов (карбаматов и эфиров). Считается, что, имея линейку трех или четырех фаз этого типа (Chiralcel OD, AD, OJ, AS), можно разделить до восьмидесяти процентов всех хиральных соединений (см. рис. Б.1).

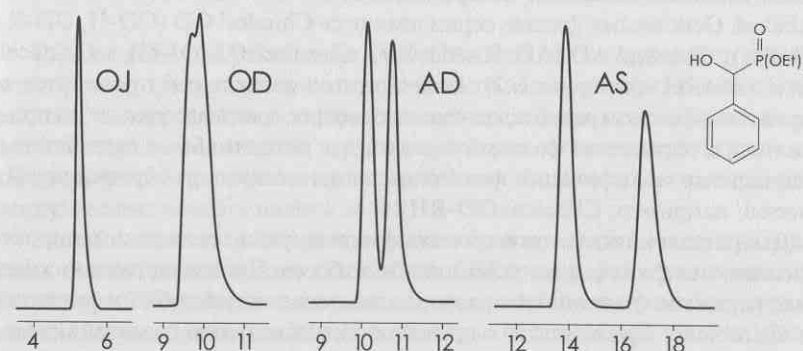


Рис. Б.1. Разделение рацемата (структурная формула приведена на рисунке) на четырех различных фазах марки Chiralcel: OJ, OD, AD и AS. Элюент: гексан-изопропанол 100 : 10. Разделение выполнено М. Ильиным (старшим)

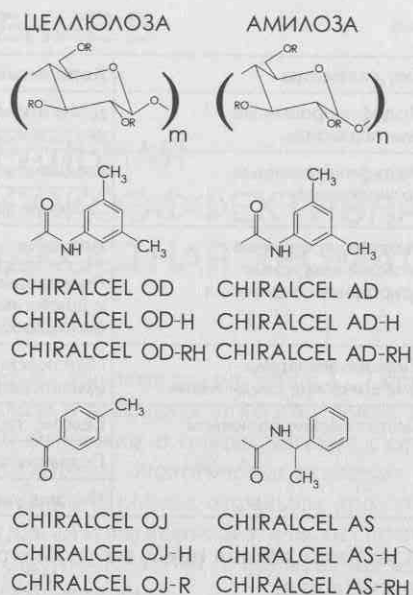


Рис. Б.2. Модификации фаз Chiralcel. Префикс «О» — производное целлюлозы, префикс «А» — производное амилозы

Эти неподвижные фазы получают прививкой модифицированных полисахаридов на силикагельную основу. Производство налажено фирмой Diacel Chemical Industries, которая выпускает их под общим названием Chiralcel. Основными фазами серии являются Chiralcel OD (OD-H, OD-R, OD-RH), Chiralcel AD (AD-H, AD-RH), Chiralcel OJ (OJ-H) и Chiralcel AS-H (AS-RH) (см. рис. Б.2). Большинство разделений проводятся в нормально-фазовом режиме, однако в последнее время широко начал применяться и обращенно-фазовый вариант, для которого были разработаны специальные модификации фаз (их названия включают аббревиатуру R, reversed, например, Chiralcel OD-RH).

Для разделения энантиомеров водорастворимых соединений широко применяются фазы с привитыми антибиотиками. Производство таких фаз было налажено фирмой Astec, которая выпускает их под общим названием Chirobiotic: Chirobiotic V с привитым антибиотиком ванкомицином, Chirobiotic R с ристоцетином, Chirobiotic T с привитым тейкопланином и Chirobiotic TAg — его производным. Эти фазы, первоначально разработанные для разделения аминокислот, прекрасно справляются с разделением многих гидрофильных хиральных соединений (см. рис. Б.3).

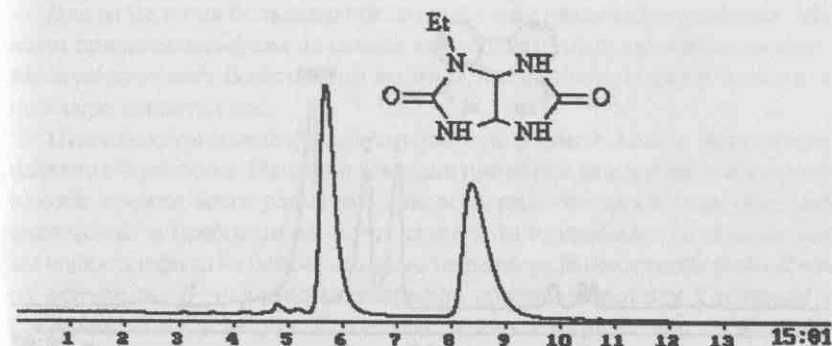


Рис. Б.3. Разделение рацемата гидрофильного соединения на фазе Chirobiotic TAg. Элюент метанол-вода 1 : 1. Разделение выполнено М. Ильным (старшим)

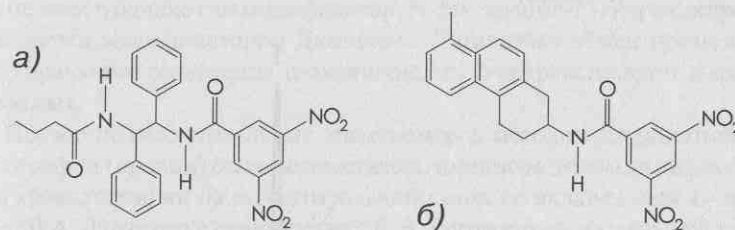


Рис. Б.4. Хиральные селекторы наиболее широко применяемых фаз пиркловского типа: (а) Pirkle ULMO, (б) Whelk-O,1

Гораздо реже для разделения водорастворимых соединений применяются фазы с привитыми белками. Недостатками таких фаз являются невысокая универсальность, эффективность и стабильность. В то же время, для некоторых соединений, структура которых сходна со структурой антигенов, фазы с привитыми протеинами способны проявлять непревзойденную селективность вплоть до $\alpha = 10-30$ и выше.

Значительная часть хиральных разделений проводится на так называемых фазах Пиркловского (Pirkle-type CSPs), или фазах типа «щетki» (brush-type CSPs). Хиральными селекторами служат низкомолекулярные энантиомеры, привитые на силикагельную основу. Пиркловские фазы, как правило, применяются для нормально-фазовых разделений.

Одной из достаточно популярных фаз пиркловского типа для нормально-фазовых определений является Whelk-O,1 фирмы Regis; структурная формула хирального селектора приведена на рис. Б.4.

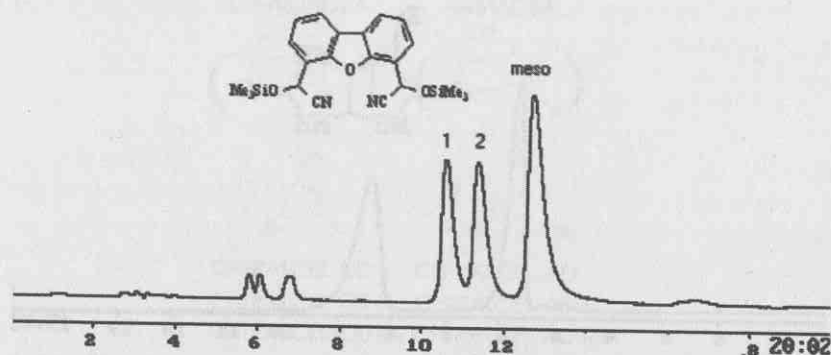


Рис. Б.5. Разделение пары энантиомеров и мезо-формы соединения (структура приведена на рисунке) на фазе 250 × 4,6 Whelk-O,1. Элюент: гексан-изопропанол 100 : 4. Разделение выполнено М. Ильным (старшим)

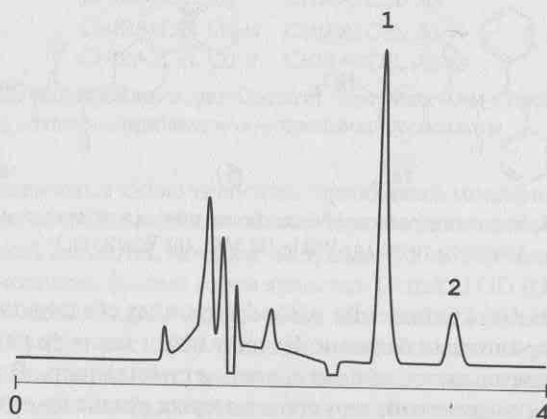


Рис. Б.6. Разделение смеси неравных количеств энантиомеров N,N'-ди(2,4-динитробензил)-транс-1,2-диаминоциклогексана на фазе Kromasil Chiral DMB. Элюент: гексан-этилацетат 85 : 15

К хиральным фазам на основе синтетических полимеров можно причислить Kromasil Chiral DMB и Kromasil Chiral TBB производства ЕКА Chemicals, полученные закреплением диметилбензоил- и третбутилбензоил-модифицированных тартрамидных полимеров на силикагельную основу. Эти фазы применяются для нормально-фазовых разделений (см. рис. Б.6).

Для разделения большого числа хиральных веществ до недавнего времени применялись фазы на основе циклодекстринов, привитых на силикагельную основу. В настоящее время применение этих фаз в значительной мере сократилось.

Циклодекстриновые фазы выпускаются фирмой Astec и носят общее название Cyclobond. Применяемые для прививки циклодекстрины отличаются прежде всего размером олигосахаридного цикла: наименьшим является α - и наибольшим — γ -циклодекстрин; наиболее универсальными являются фазы на основе среднего по размеру β -циклодекстрина. Фазы на основе α -, β - и γ -циклодекстринов обозначаются как Cyclobond I, Cyclobond II и Cyclobond III соответственно. Применяются также модификации этих фаз с дериватизированными циклодекстринами.

Динамическим модифицированием обращенных фаз N-гексадецил-L-гидроксипролином с последующей пропиткой солью меди (II) получают фазы для лигандообменной хиральной хроматографии. Названия этот метод не имеет, однако сам модификатор, N-гексадецил-L-гидроксипролин, называется модификатором Даванкова. Лигандный обмен применяется для хирального разделения α -аминокислот, α -гидроксикислот и их производных.

Первое полное разделение энантиомеров методом жидкостной хроматографии (пролин) было осуществлено именно методом лигандообменной хроматографии на полистирольной смоле со включенным L-пролином (В.А. Даванков в соавторстве с С.В. Рогожиным, патент 1968 г.).

Б.2. Закономерности хиральной ВЭЖХ

Одна из особенностей хиральной хроматографии состоит в том, что для разделения на энантиомеры адсорбат должен взаимодействовать с адсорбентом по крайней мере тремя центрами — только в этом случае хиральное распознавание становится вообще возможным. Конечно, в оптимальном варианте должно достигаться множественное взаимодействие адсорбатов-энантиомеров с хиральным селектором.

Таким образом, для повышения универсальности хиральных фаз разработчиками всегда проводится поиск таких селекторов, которые обеспечивали бы по возможности максимально возможное количество взаимодействий различного типа. В результате, механизм удерживания для большинства хиральных фаз, как правило, является смешанным, то есть определяется суммой различных типов удерживания. Причем, надо сказать, величины вкладов могут существенно различаться в зависимости от химической природы разделяемых адсорбатов.

Так, при работе с неполярными элюентами (например, на основе гексана) на многих хиральных фазах можно наблюдать смесь нормально-фазового типа удерживания в сочетании с удерживанием за счет переноса заряда. Наиболее ярко эти закономерности отслеживаются на полисахаридных фазах Chiralcel и пиркловских фазах типа Whelk-O,1, поскольку они содержат в своей структуре как полярные функциональные группы, так и мощные ароматические системы. При их применении тип удерживания с переносом заряда доминирует, если адсорбатами являются слабополярные ароматические соединения; нормально-фазовый тип удерживания, соответственно, преобладает для полярных неароматических адсорбатов.

Удерживание на тейкоплаиновых и ванкомициновых фазах при работе с элюентами, обогащенными водным компонентом, определяется в основном ионообменным и обращенно-фазовым типами удерживания, а при работе на элюентах, обогащенных органическим растворителем, — нормально-фазовым и ионообменным типами удерживания.

Успешность разделения пары энантиомеров на определенной хиральной фазе зависит от многих факторов. До того как приступить к их рассмотрению, нам придется обратиться к понятию *хиральной полости* (chiral cavity), которое широко применяется для построения моделей удерживания и дискриминации энантиомеров хиральными селекторами.

Хиральной полостью будем считать адсорбционный центр хирального селектора, включая его микроокружение (которое также участвует в связывании молекулы энантиомера). Один хиральный селектор может иметь в общем случае несколько хиральных полостей, причем даже для одного из энантиомеров пары. Например, молекула альбумина содержит один сайт связывания с R-ибупрофеном и по крайней мере два — с S-ибупрофеном.

Как было установлено в специальных исследованиях, для полисахаридных фаз хиральной полостью может являться каждая структурная единица спирали, то есть каждый модифицированный остаток глюкозы. Для фаз пиркловского типа хиральной полостью является молекула селектора и ее ближайшее окружение (включая спейсер). Для циклодекстриновых фаз хиральной полостью является молекула циклодекстрина, образующая с адсорбатами комплексы включения.

Отсутствие разделения энантиомеров (имеется в виду $\alpha = 1$) может объясняться несколькими причинами.

Во-первых, разделения энантиомеров не происходит, если адсорбаты не проникают в хиральную полость. В свою очередь, это может быть вызвано тем, что:

- 1) размер молекулы адсорбата, или размер хиральной части его структуры, больше размера хиральной полости (см. рис. Б.7);

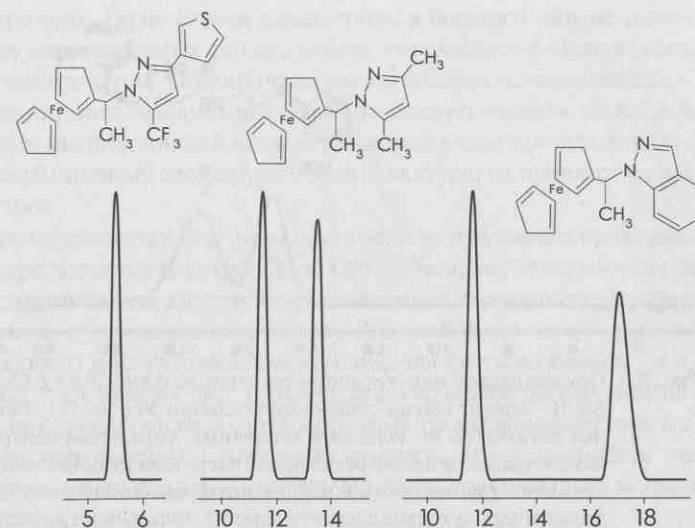


Рис. Б.7. Разделение ряда производных ферроцена на фазе 250 × 4,6 Chiralcel OD-H. Элюент: гексан-изопропанол 100 : 4. Разделение выполнено М. Ильиным (старшим). Разделение уменьшается справа налево при замене достаточно компактного и способствующего удерживанию ароматического кольца на две метильные группы, а затем исчезает при замене одной метильной группы на более объемную трифторметильную, а другой — на более объемную тифенильную

- 2) адсорбат не может проникнуть сквозь адсорбционный слой полярного модификатора, блокирующий хиральную полость (в нормально-фазовом режиме).

Во-вторых, даже если адсорбат проникает в хиральное окружение, дискриминация энантиомеров может не происходить, так как:

- 3) при связывании не происходит реализации трех или более контактов, которые были бы достаточны для хирального распознавания;
- 4) адсорбат связывается с хиральной полостью преимущественно не хиральным участком.

В случаях 1 и 3 разделение принципиально невозможно осуществить на выбранной неподвижной фазе. В случае 4 разделение можно провести, если значительно изменить хроматографическую систему. К примеру, можно перейти от нормально-фазовых условий к обращенно-фазовым или наоборот, если это возможно. Добиться разделения путем коррекции состава подвижной фазы и/или температуры можно только во втором случае.

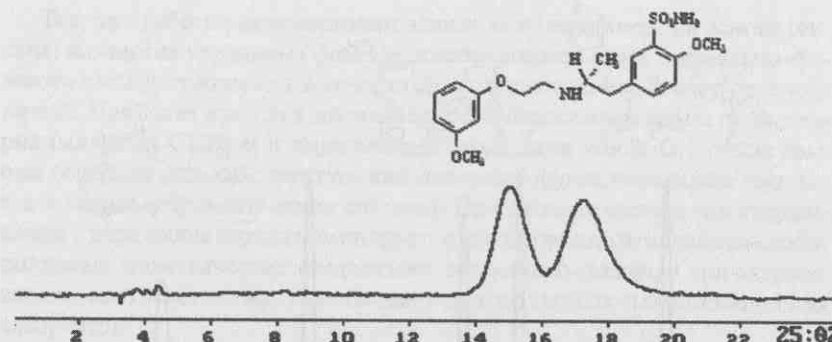


Рис. Б.8. Пример разделения «трудного» рацемата на фазе 250 × 4,6 Chiralcel AS-H. Элюент гексан-этанол-триэтиламин 50 : 50 : 0,1. Разделение выполнено М. Ильиным (старшим). Хиральный центр одинаково удален от наиболее полярной части молекулы (вблизи сульфамидной группы) и от ароматических фрагментов (одно и другое ароматические кольца с заместителями). Только один заместитель при хиральном центре способен взаимодействовать с адсорбентом (аминогруппа). Разделение было достигнуто только на одной фазе, Chiralcel AS-H, причем оно не было стабильным — селективность зависела от трудно контролируемых параметров

Некоторые структуры могут быть достаточно «трудными» для хирального разделения (см. рис. Б.8). Можно выделить несколько признаков, по которым «трудные» рацематы быстро распознаются:

- 1) заместители при хиральном центре — небольшие и неполярные, примерно одинакового объема (пример: хлор- и метил-);
- 2) заместители при хиральном центре по химической природе и структуре очень похожи, особенно вблизи хирального центра;
- 3) молекула адсорбата достаточно крупная, с разветвленными алифатическими заместителями (в случае неудачного разделения в нормально-фазовом режиме можно попробовать разделить такое соединение в обращенно-фазовой системе);
- 4) хиральный центр крупной молекулы сильно удален от ее наиболее полярного фрагмента или фрагмента с наиболее мощной ароматической системой.

В том случае, когда недостаточная селективность разделения энантиомеров обусловлена образованием адсорбционного слоя полярного модификатора, блокирующего хиральную полость, разделение может быть, в принципе, улучшено путем изменения состава подвижной фазы и/или

температуры. Такие случаи характерны, в большей или меньшей степени, для всех хиральных фаз при работе в нормально-фазовом режиме хроматографирования. Общий принцип улучшения разделения здесь можно сформулировать следующим образом: следует создать такие условия, в которых адсорбционный слой не образуется или происходит его замена на адсорбционный слой другого модификатора, не препятствующего разделению.

Примером хиральной фазы, к которой этот принцип применим в полной мере, является Kromasil Chiral DMV. Фаза, как было упомянуто, получена закреплением диметилбензоил-модифицированного тартрамидного полимера на силикагельную основу. Для этой фазы вклад квази-нормально-фазового типа удерживания невелик, значительно меньше, чем для типичных пиркловских фаз. В результате, хиральное распознавание происходит по большей части за счет водородных связей амидных групп и влияния стерического фактора. Стоит также отметить, что и полярность этой фазы невысока — меньше, чем у нитрильной фазы, и значительно меньше, чем у силикагеля.

Применение спиртов (особенно с разветвленными заместителями) как полярных добавок приводит в этом случае к резкому уменьшению селективности разделения. По этой причине, в качестве полярных добавок при применении Kromasil Chiral DMV применяют эфиры. Спирты, по-видимому, блокируют амидные функциональные группы — при этом блокируются и хиральные полости. Этот эффект большей частью связан именно с поверхностью, поскольку для его проявления достаточно совсем небольшой концентрации спиртов в элюенте. Оптимальной полярной добавкой для Kromasil Chiral DMV является метил-третбутиловый эфир, который, из-за трет-бутильного заместителя, обладает наименьшей модифицирующей способностью даже среди эфиров.

Подобные закономерности характерны также и для пиркловских, и для полисахаридных фаз (см. рис. Б.9). Многие исследователи отмечали, что селективность разделения на них увеличивается при переходе от протонных полярных добавок к апротонным.

Большое число случаев влияния адсорбционного модифицирования и перемодифицирования на селективность разделения энантиомеров выявлено для полисахаридных фаз серии Chiralcel.

Эти фазы характеризуются как наиболее высоким среди хиральных фаз вкладом типа удерживания с переносом заряда (поскольку содержат замещенные ароматические фрагменты), так и чрезвычайно высокой полярностью, сравнимой или даже большей, чем у силикагеля. Еще одна их особенность связана с тем, что производителем не рекомендуется приме-

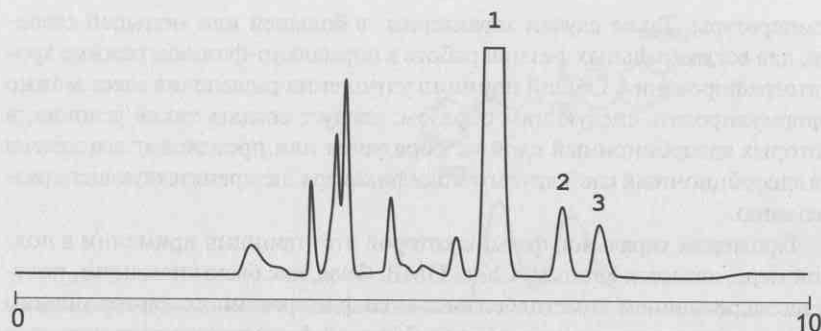


Рис. Б.9. Разделение рацемата аллилметилфенилкарбинола (2, 3) на фазе $250 \times 4,6$ Chiralcel OD-H. Элюент: гексан-хлороформ-уксусная к-та 95 : 3 : 2. При применении в качестве элюента системы гексан-изопропанол разделения не наблюдалось. Разделение было достигнуто при замене изопропанола на уксусную кислоту. Добавление в элюент хлороформа было вызвано необходимостью разделения рацемата (2, 3) от пика ацетофенона (1)

нять элюенты на основе иных растворителей кроме гексана, спиртов и воды (возможны небольшие добавки кислот и аминов) — поскольку эта фаза не привита к поверхности силикагеля, а осаждена в поры. Соответственно, при разделении полярных соединений без спиртов бывает не обойтись.

Селективность разделения можно увеличить, применяя спирты с меньшим заместителем или добавляя в элюент гексан-спирт небольшие количества воды. В последнем случае происходит перемодификация поверхности адсорбента, то есть молекулы спирта, блокирующие хиральные полости, заменяют молекулы воды. Следует также заметить, что подобный процесс происходит и при замене одного спирта на другой, поскольку при этом нередко наблюдается значительное изменение селективности вплоть до инверсии порядка элюирования энантиомеров.

Один из наиболее ярких примеров увеличения разделения энантиомеров вследствие перемодификации поверхности наблюдался при анализе бензимидазола тимопразола, проведенного на фазе Chiralpak AD при варьировании доли метанола в подвижной фазе гексан-изопропанол 80 : 20. При составах элюента гексан-изопропанол-метанол от 80 : 20 : 0 до 80 : 15 : 5 разделение едва намечается. При достижении концентрации метанола в элюенте 5% наблюдается резкий скачок времени удерживания второго (более удерживаемого) энантиомера при неизменном времени удерживания первого энантиомера. В результате, происходит резкое увеличение

селективности разделения, которое не изменяется при дальнейшем увеличении концентрации метанола в элюенте.

Такие же случаи наблюдались и с применением воды в качестве перемодификатора. Иногда эти случаи бывали курьезными, как, к примеру, при разработке методики разделения полярных амидов 2-оксо-3-пиперидин-ацетамидов на фазе Chiralcel OD. Разделение, полученное в одной лаборатории на элюенте гексан-этанол 90 : 10 с 0,1% ТФУ, не воспроизвелось в другой лаборатории — разделения не наблюдалось. Оказалось, что во второй лаборатории этанол был абсолютный, тогда как в первой — обычный азеотроп с водой. Таким образом, в первом элюенте содержалось еще порядка 0,38% воды, именно за счет которой (как было проверено) и достигалось полное разделение.

Добавление воды не всегда приводит к увеличению селективности. Отмечены случаи, когда удерживание и селективность очень слабо зависят от концентрации воды в диапазоне 1–2 г/л; такая зависимость наблюдалась для α -гидроксиметопролола на фазе Chiralcel OD. По всей видимости, такой полярный адсорбат способен «пробить» любой адсорбционный слой. При увеличении концентрации воды удерживание второго энантиомера может уменьшаться при неизменном времени удерживания первого, что приводит к уменьшению селективности. Такая ситуация наблюдалась при хроматографировании метопролола на фазе Chiralcel OD. Метопролол менее полярный, чем α -гидроксиметопролол, и именно этим можно объяснить то, что вода в данном случае уже выступает как модификатор, блокирующий хиральные полости.

Важным параметром, который необходимо контролировать при проведении разделений на полисахаридных фазах, является температура. Нередки случаи, когда при изменении температуры происходило изменение селективности вплоть до инверсии порядка элюирования энантиомеров. В целом же, несмотря на такие тонкости, полисахаридные фазы остаются на сегодняшний день наиболее универсальными хиральными неподвижными фазами.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

СПИСОК МЕЖДУНАРОДНЫХ СОКРАЩЕНИЙ, ПРИНЯТЫХ В ХРОМАТОГРАФИИ

A

A – amino, amino
Amino – аминофаза

B

Butyl – бутил
BIO – for bioseparations, для разделения пептидов, белков, нуклеотидов, нуклеиновых кислот

C

C1, C4, C8, C18, C30 – углеводородные радикалы с соответствующим числом атомов углерода
CN, Cyano – циано, нитрильная фаза
CMC – critical micelle concentration, критическая концентрация мицеллообразования, ККМ
CSP – chiral stationary phase, хиральная неподвижная фаза

D

Dansyl (5-N,N-dimethylaminonaphthylene-1-sulfonyl chloride) – дансил (derivatizing reagent for amino group, hydroxyl group)
Dabsyl (4-N,N-dimethylaminoazobenzene-4-sulfonyl chloride) – дабсил (derivatizing reagent for amino group, hydroxyl group)
DVB – divinylbenzene, дивинилбензол
DEA – diethylamine, диэтиламин
DEAE – diethylaminoethyl, диэтиламиноэтил
DEAM – diethylaminomethyl, диэтиламинометил
DMAC – dimethylacetamide, диметилацетамид (растворитель)

МС-АНАЛИТИКА

TEXTRONICA AG

www.textronica.com

+7 (495) 995 88 90

+7 (495) 937 96 33

DMF – dimethylformamide, диметилформамид (растворитель)
DMSO – dimethylsulfoxide, диметилсульфоксид (растворитель)
DNPH – dinitrophenylhydrazine, динитрофенилгидразин, ДНФГ (derivatizing reagent for carbonyl group)

E

EC – electrokinetic chromatography, электрокинетическая хроматография
ECD – electrochemical detection, электрохимическое детектирование
ELSD – evaporative light scattering detector, испарительный детектор светорассеяния
E – endcapped, эндкеппированный
em – emission, длина волны эмиссии
EMLC – electrochemically modulated liquid chromatography, электрохимическая жидкостная хроматография
EPA – Environmental Protection Agency
ex – excitation, длина волны возбуждения

F

FMOK – 9-fluorenylmethylchloroformate, (derivatizing reagent for amino acids)
FLD – fluorescence detection, флуоресцентное детектирование
FPLC – fast protein liquid chromatography, метод жидкостной хроматографии для быстрого разделения белковых соединений

G

GFC – gel filtration chromatography, гель-фильтрационная хроматография
GPC – gel permeation chromatography, гель-пермеационная хроматография

H

HETP – height equivalent to a theoretical plate, высота, эквивалентная теоретической тарелке, ВЭТТ
Hexyl – гексил
Hexyl-Phenyl – 1-фенилгексил
HPLC – high performance liquid chromatography, высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭЖХ
HPCE – high performance capillary electrophoresis, высокоэффективный капиллярный электрофорез, ВЭКЭ
HP – hydrophilic polymer, гидрофильный полимер
HFIP – hexafluoroisopropanol, гексафторизопропанол (растворитель для эксклюзионной хроматографии)

МС-АНАЛИТИКА

TEXTRONICA AG

www.textronica.com

+7 (495) 995 88 90

+7 (495) 937 96 33

HIC – hydrophobic interaction chromatography, гидрофобная хроматография
HILIC – hydrophilic interaction chromatography, гидрофильная хроматография

I

IC – ion chromatography, ионная хроматография
ID – internal diameter, внутренний диаметр
IEC – ion-exchange chromatography, ионообменная хроматография
IEX – ion-exclusion chromatography, ион-эксклюзионная хроматография
IPA – isopropanol, изопропанол (растворитель)
IP – ion-pair, ион-парный
IR – infrared, инфракрасный

L

LEC – ligand-exchange chromatography, лигандобменная хроматография
LC – liquid chromatography, жидкостная хроматография

M

MCX – medium cation-exchange, умеренная катионообменная фаза
MAX – medium cation-exchange, умеренная анионообменная фаза
МЕКС – micellar electrokinetic chromatography, мицеллярная электрокинетическая хроматография
MCAC – metal chelate affinity chromatography, металлохелатная аффинная хроматография
MOS – methyloctasilane, метилоктасилан, C8 обращенная фаза
MS – mass spectrometry, масс-спектрометрическое детектирование
MTBE – methyl tert-butyl ether, метилтретбутиловый эфир (растворитель)
MW – molecular weight, молекулярная масса

N

N – efficiency, эффективность
NE – non-encapped, неэнкеппированный
NH₂ – amino, амино, аминофаза
NMP – N-methyl pyrrolidone, (растворитель для эксклюзионной хроматографии)
NO₂ – nitro, нитро, нитрофаза
NP – normal phase, нормально-фазовый

O

Octyl – октил
OD – outer diameter, внешний диаметр

МС-АНАЛИТИКА

TEXTRONICA AG

www.textronica.com

+7 (495) 995 88 90

+7 (495) 937 96 33

ODS – octadecylsilane, октадецилсилан, ОДС (то же, что C18)
OPA – o-phthalic aldehyde, о-фталевый альдегид (derivatizing reagent на аминогруппу)

P

PAH – polyaromatic hydrocarbon, полиароматические углеводороды, ПАУ
Ph, Phenyl – фенил
PM – polar modified, модификация полярным реагентом
PS – polystyrene, полистирол
PVA – polyvinyl alcohol, поливиниловый спирт
PVC – polyvinyl chloride, поливинилхлорид
PHM – polyhydroxymethacrylate, полигидроксиметакрилат
PMM – polymethylmethacrylate, полиметилметакрилат
PE – polar-encapped, полярный эндкеппинг
PFP – pentafluorophenyl, пентафторфенил
PEEK – polyetherether ketone, (полимерный материал, заменитель стали)
PEG – polyethylene glycol, полиэтиленгликоль
PEI – polyethyleneimine, полиэтиленимин
PFA, PTFE – Teflon, тефлон
PFPA – pentafluoropropionic acid, пентафторпропионовая кислота (ион-парный реагент, применяемый для анализа недериватизованных аминокислот)
PITC – phenylisothiocyanate, фенилизотиоцианат, ФИТЦ (derivatizing reagent на аминогруппу)
PRP – polymeric reversed phase, полимерная обращенно-фазовая
psi – pounds per square inch, единица давления, 1 atm = 14.68 psi
PTH – phenylthiohydantoin, фенилгидантоин производные (derivatized PITC производные)

Q

QAA – quaternary alkyl ammonium, четвертичные аминогруппы

R

RP – reversed phase, обращенно-фазовый
RI – refractive index, рефрактометрическое детектирование
RSD – relative standard deviation, среднее квадратическое отклонение, СКО

S

SCX – strong cation-exchange, сильная катионообменная фаза
SAX – strong anion-exchange, сильная анионообменная фаза
Si, Sil – silica, силикагель

МС-АНАЛИТИКА

TEXTRONICA AG

www.textronica.com

+7 (495) 995 88 90

+7 (495) 937 96 33

SA — сульфированный
 S-DVB — styrene-divinylbenzene, стирол-дивинилбензол
 SDS — sodium dodecyl sulfonate, додецилсульфонат натрия (ион-парный реагент)
 SHS — sodium hexyl sulfonate, гексилсульфонат натрия (ион-парный реагент)
 SEC — size exclusion chromatography, эксклюзионная хроматография
 SFC — supercritical fluid chromatography, сверхкритическая флюидная хроматография
 SFE — supercritical fluid extraction, сверхкритическая флюидная экстракция
 SPE — solid phase extraction, твердофазная экстракция, ТФЭ

T

TEA — triethylamine, триэтиламин, ТЭА
 TFA — trifluoroacetic acid, трифторуксусная кислота, ТФУ
 THF — tetrahydrofuran, тетрагидрофуран, ТГФ (растворитель)
 TLC — thin-layer chromatography, тонкослойная хроматография, ТСХ

U

UPLC — ultra-pressure liquid chromatography, жидкостная хроматография сверхвысокого давления
 UV — ultraviolet, детектирование в ультрафиолетовом диапазоне

W

WCX — weak cation-exchange, слабая катионообменная фаза
 WAX — weak anion-exchange, слабая анионообменная фаза

Z

Zir — zirconia, окись циркония

МС-АНАЛИТИКА

TEXTRONICA AG

www.textronica.com

+7 (495) 995 88 90

+7 (495) 937 96 33

Высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия компании Waters

Фирма Waters является в настоящее время крупнейшим в мире производителем оборудования для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. Компания Waters была создана в 1958 году, основателем ее был г-н Jim Waters.

На сегодняшний день Waters — это независимая, динамично развивающаяся корпорация, насчитывающая около 4000 сотрудников в 52 странах мира. Уже 40 лет существует в нашей стране представительство фирмы Waters. За это время нашими хроматографами оборудованы крупнейшие фармацевтические заводы, научно-исследовательские институты, лаборатории по контролю качества пищевой продукции и анализу загрязнения окружающей среды и т.п. на всей территории бывшего СССР. Успешное развитие компании приводит к тому, что в ее составе появляются подразделения, ранее являвшиеся независимыми производителями ВЭЖХ продукции. Так, в 1997 году к корпорации Waters присоединилась фирма Phase Separation Ltd., производитель хроматографических колонок для ВЭЖХ, а в 1998 году — компания Micromass Ltd., лидер в производстве настольных масс-спектрометров для ВЭЖХ. В 2000 году была создана российская фирма ООО «Уотерс», занимающаяся продажей и поставкой жидкостных хроматографов, запасных частей, расходных материалов и хроматографических колонок за рубли. В августе 2003 года в состав корпорации вошла софтовая немецкая компания CREON LAB CONTROL AG, а в январе 2004 года — американская NuGenesis.

Компания Waters предлагает широкий выбор как модульных приборов, включающих различного рода насосы (изократические, градиентные, для препаративных исследований), детекторы (УФ, с фотодиодной матрицей, рефрактометрический, флуоресцентный, кондуктометрический, различного рода масс-спектральные), инжекторы (ручные и автоматические), так и ряд специализированных систем, на которых хочется остановиться подробнее.

Системы Alliance

Система Alliance значительно превосходит традиционные системы ВЭЖХ. Автоматическая диагностика, постоянно регистрирующая все, что происходит с системой, и протокол реального времени возникающих в системе событий обеспечат Вам возможность постоянного наблюдения за работой системы, что важно для соответствия GLP (хорошей лабораторной практике) и для контроля необходимости профилактического обслуживания. Следствием такого сочетания повышенной надежности и самодиагностики является то, что системы Alliance поставляются с полной гарантией на один год и двухлетней гарантией на механику модуля управления элюентом и пробами. Все системы Alliance изготавливаются с точ-

ным соблюдением рабочих характеристик, таким образом любые аналитические методы могут быть легко перенесены с одной системы **Alliance** на другую, что поддерживает постоянство результатов от прибора к прибору, от лаборатории к лаборатории.

Сепарационный модуль — это сердце каждой системы **Alliance** и яркий пример того, как Waters применяет новую технологию и новаторский дизайн для улучшения традиционных систем ВЭЖХ, устанавливая новый стандарт качества в хроматографии.

Сепарационный модуль возможен в трех вариантах:

- **сепарационный модуль 2695**. Имеет встроенный автосамплер, в конструкцию которого входит система подачи исследуемых образцов в блок забора проб. Отбор осуществляется из стандартных пробирок (5 каруселей на 24 образца каждая);
- **сепарационный модуль 2795HT**. Данный сепарационный модуль имеет похожую конструкцию, но отбор проб осуществляется из плашек на 24, 48, 96 и 324 пробы;
- **2695 D (Dissolution)** — для автоматического выполнения тестов на растворимость. Отличается от стандартного модуля 2695 наличием 6 или 8 игл в отделении автосамплера, предназначенных для заполнения пустых пробирок, установленных в автосамплер, пробами, отбираемыми из сосудов мешалки.

Наличие в сепарационном модуле собственного процессорного блока и соответствующего программного обеспечения позволяет в комбинации с некоторыми детекторами, имеющими собственный монитор для отображения результата хроматографирования, использовать его независимо от внешнего источника управления и контроля (компьютера), а наличие 3,5 дюймового дисковод для гибких магнитных дисков объемом 1,44 МБ делает возможным сохранение, загрузку и перенос созданных и применяемых методов исследования.

При работе с системой **Alliance**, управляемой внешним компьютером с программным обеспечением Millennium³² и Empower, становятся возможными управление рабочими параметрами системы и осуществление обработки результатов хроматографирования и диагностики. Также возможна работа в локальной сети на базе технологии клиент-сервер.

Системы Waters Breeze

Системы Waters **Breeze** сочетают в себе высокую технологию приборов Waters и в то же время простоту в использовании и обслуживании.

Системы **Breeze** комплектуются насосом, инжектором, детектором и собственным программным обеспечением. Как и все приборы нашей фирмы, системы **Breeze** обеспечиваются полной сервисной поддержкой.

Вы можете подобрать оптимальную для себя систему **Breeze**, выбрав насос, инжектор и детектор по Вашему усмотрению. Кроме того, Вы можете увеличить функциональность Вашей системы **Breeze**, выбрав дополнительные модули. Для управления системами **Breeze** предлагается специальное программное обеспечение, адаптированное для пользователей, имеющих начальный опыт работы с ВЭЖХ. Четыре простых окна программы позволяют Вам осуществлять контроль работы Вашей системы **Breeze** и обрабатывать полученные результаты.

Также стоит отметить, что все модули, используемые в системе **Breeze**, и сама система совместимы с программным обеспечением Millennium³² и Empower.

Новая эра в хроматографии — системы Acquity UPLC

UPLC — сверхпроизводительная жидкостная хроматография, новая категория в науке об аналитических разделениях, которая, базируясь на принципах ВЭЖХ, увеличивает связанные между собой параметры скорости, чувствительности и разрешения.

Системы Acquity UPLC представляют собой совершенно новую конструкцию с продвинутыми технологиями в насосе, автоинжекторе, системе обработке данных и сервисных диагностиках. Предел рабочего давления для UPLC составляет 15000 psi. Для работы с системой Acquity разработаны специальные колонки с размером частиц 1,7 мкм, упакованные под высоким давлением. По сравнению с традиционными ВЭЖХ системами Acquity UPLC — это скорость, увеличенная в 9 раз, чувствительность, увеличенная в 3 раза, и разрешение, увеличенное в 1,7 раза.

Система ACQUITY UPLC была разработана с нуля для обеспечения минимального системного объема, чтобы полностью воспользоваться преимуществом низкой дисперсии и технологией маленьких частиц.

Разделения с высокой пиковой емкостью, достижимые с маленькими частицами, требуют более высоких давлений, чем те, которые достижимы с сегодняшним ВЭЖХ оборудованием. Рассчитанное давление при оптимальном потоке для достижения максимальной эффективности на 15-сантиметровой колонке, упакованной 1,7 мкм частицами, — около 15 тыс. фунтов на квадратный дюйм (PSI). Таким образом, требуется насос, способный подавать раствор точно и воспроизводимо при таких давлениях, а также компенсировать сжимаемость раствора и работать как в градиентном, так и изократическом режимах разделений.

С частицами 1,7 мкм были получены пики с шириной на половине высоты менее чем за 1 с. Таким образом, предъявляются соответствующие требования к детектору. Для того чтобы точно и воспроизводимо продетектировать пик, скорость измерения должна быть достаточно высока, чтобы набрать достаточное количество точек по ширине пика, в добавление ячейка детектора должна иметь минимальный объем, чтобы сохранить эффективность разделения. Теоретически, увеличение чувстви-

тельности по сравнению с ВЭЖХ должно быть на уровне в 2–3 раза, в зависимости от применяемого типа детекции. Масс-спектрометрическая детекция значительно улучшается с UPLC — увеличенная концентрация внутри пика с уменьшенной хроматографической дисперсией на уменьшенных потоках (без делителей потока) обеспечивает лучшую эффективность ионизации и увеличивает чувствительность.

Ввод образца также критичен. Традиционные инъекционные клапаны, автоматические или ручные, разработаны не для высоких давлений. Для защиты колонки от экстремальных флуктуаций давлений процесс инъекции должен быть относительно безимпульсационным.

Рабочий объем системы также должен быть минимальным для уменьшения потенциального расползания пиков. Быстрый цикл инъекции также необходим, чтобы полностью воспользоваться скоростью, обеспечиваемой UPLC, которая в свою очередь требует высокой емкости отделения для образцов. Инъекции низкого объема с минимальным переносом пробы также необходимы для реализации возросшей чувствительности.

Система Acquity UPLC состоит из бинарного градиентного насоса, системы подачи образцов (включая нагреватель колонки), детектора и, как дополнение, элеватора для подачи плашек. Бинарный градиентный насос имеет две головки, соединенные последовательно в каждом из насосов, создающие градиент на высокой стороне давления. Имеется встроенный дегазатор для 4-х входных линий для растворителей (одновременно используются две). **Предел рабочего давления для UPLC 15 000 psi (1000 bar).** Цикл инжектора 25 с без промывки и 60 с с промывкой двумя растворителями для уменьшения переноса пробы. Большое количество плашек разнообразных форматов может быть использовано в термостатируемом автоинжекторе. При применении дополнительного элеватора для подачи плашек до 22-х плашек могут быть проанализированы в автоматическом режиме. Нагреватель колонки (до 65 °C) сконструирован в поворотном варианте для размещения выхода колонки в непосредственной близости от входа в масс-спектрометр.

УФ-детекторы (обычный и PDA) имеют новую электронику для поддержания Ethernet-коммуникации и высокоскоростного измерения узких пиков. Так как УФ-детекторы чувствительны к концентрации образца, объем ячеек должен быть уменьшен для поддержания соответствия между концентрацией и уровнем сигнала. Уменьшение объема ячейки в то же время приводит к уменьшению оптического пути поперечного сечения, что в свою очередь приводит к уменьшению полезного сигнала и увеличению шума. Поэтому вместо традиционной ячейки ВЭЖХ была разработана специальная ячейка UPLC (light guided flow cell), которая при объеме в 500 нл имеет стандартную длину оптического пути 10 мм.

Капилляры и соединения созданы и проложены между компонентами системы для обеспечения минимальной дисперсии, также применены датчики утечек, сигналы от которых учитываются программой.

Колонки и расходные материалы. Waters предлагает широкий выбор аналитических, микроборных, препаративных колонок с различным видом привитой фазы и размера частиц. Колонки Waters — это превосходная воспроизводимость, устойчивая работа в диапазоне pH от 1 до 12, отличное удерживание как полярных, так и неполярных компонентов. Наши колонки изготовлены с применением современных технологий и отвечают самым жестким требованиям, предъявляемым к продукции такого типа. Картриджи для твердофазной экстракции — как стандартные, так и уникальные Oasis — демонстрируют прекрасную воспроизводимость даже в случае высыхания патрона. Кроме того, нашей фирмой предлагается широкий выбор фильтров, пробирок и других расходных материалов для ВЭЖХ.

Программное обеспечение. Наряду с приборами корпорация Waters предлагает к использованию в лабораториях и различные виды своего программного обеспечения.

Так, вместе с оборудованием поставляется программное обеспечение **Empower, MassLynx** для управления системами, сбора и обработки данных от ВЭЖХ, ГЖХ, МС приборов. Эти программы активно применяются в лабораториях с оборудованием как собственного производства, так и с такими же типами приборов других фирм-производителей.

Программу **Empower** можно применять в любой лаборатории, использующей в своей работе газовые и жидкостные хроматографы. Программа является универсальной и может устанавливаться и применяться как на одном отдельном приборе, так и в группе из нескольких приборов для небольшой лаборатории, а также как сетевая для целой организации, имеющей в работе десятки хроматографов. Используя клиент-серверную архитектуру, данные со всех хроматографов обрабатываются, хранятся и управляются через единый сервер.

Обеспечение требований безопасности и сохранности данных, функций аудита данных, соответствия требованиям GMP/GLP, а также 21 CFR Part 11 полностью гарантировано системой.

Таким образом, использование программы **Empower** повышает продуктивность проведения каждого хроматографического анализа.

Так как на любом предприятии используется множество различных приборов, а также других источников получения информации, компания Waters предлагает в этом случае к применению на российском рынке свои программы **SDMC (Scientific Data Management System — Система управления научными данными)**, **e-Lab Notebook (электронный лабораторный журнал специально для научно-исследовательских лабораторий)**, программный продукт с огромнейшей функциональностью **QDIS-QM (Лабораторно-Информационная Менеджмент Система)**.

Представительство компании Waters:

117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Тел./факс (495) 727 44 90 и (495) 336 70 00

e-mail: waters@co.ru; www.waters.com

Возможности хромато-масс-спектрометров корпорации Thermo Fisher Scientific

Масс-спектрометры для анализа органических и биоорганических веществ можно разделить на две группы — приборы высокого и низкого разрешения. Масс-спектрометры высокого разрешения позволяют добиваться высочайшей селективности и наибольшей достоверности анализа. Корпорация **Thermo Fisher Scientific** — общепризнанный мировой лидер в области разработки и производства практически всех типов масс-спектрометров и хромато-масс-спектрометров.

LTQ FT Ultra

Это прибор с анализатором ионно-циклотронного резонанса со сверхпроводящим магнитом, обеспечивающим разрешение до 1 000 000 и точность определения массы лучше 1 ppm. Он предназначен для решения наиболее сложных и ответственных задач.

LTQ ORBITRAP

В 2005 году в Бремене был начат серийный выпуск принципиально нового масс-спектрометра, разработанного и запатентованного А.А. Макаровым. Он получил название **LTQ ORBITRAP™**. История его появления, принцип работы и конструкция неоднократно излагались А.А. Макаровым в его докладах на съездах BMSO.

LTQ ORBITRAP VELOS

Доступное на этом приборе разрешение (200 000) в сочетании с точностью определения массы (лучше 1 ppm), возможностью работы в режиме MSⁿ, низко- и высоко-энергетическая фрагментация ионов, фрагментация с переносом электрона делают его лучшим выбором для протеомики, метаболомики и ряда других сложных применений.

EXACTIVE

Также, как и **LTQ ORBITRAP**, построен на базе технологии электростатической орбитальной ловушки ионов, обеспечивает фрагментацию «всех ионов» и точное измерение масс. Этот прибор является лучшим выбором для анализа пестицидов, метаболитов лекарственных средств, антибиотиков, допингов, гормонов, наркотиков.

TSQ VANTAGE AM

Тройной квадрупольный масс-спектрометр, также способный точно определять массу ионов. При уникальной чувствительности позволяет до-

баваться высочайшей точности количественного анализа и селективности в случае анализа сложных многокомпонентных смесей.

Все вышеперечисленные модели масс-спектрометров оснащаются источниками ионизации при атмосферном давлении и могут сочетаться с системами высокоэффективной и сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии.

В то же время высокое разрешение необходимо и для анализа соединений, которые можно перевести в газовую фазу при нагревании и вводить в источник ионов напрямую или при разделении на газовой хроматографической колонке. Известными примерами анализа, требующими высочайшей достоверности, достигаемой за счет селективности, чувствительности и точного измерения массы, являются анализ анаболических стероидов и супертоксикантов, таких как диоксины. Этим высоким требованиям отвечает масс-спектрометр с двойной фокусировкой **Thermo Scientific DFS**.

Газовыми хроматографами (**Thermo Scientific FOCUS GC** и **TRACE GC ULTRA**) и источниками ионизации электронным ударом (плюс химической ионизации как опции) оснащаются масс-спектрометрические детекторы.

DSQ II — квадрупольный прибор с искривленным квадрупольным префильтром с самым лучшим отношением сигнал/шум. Комбинация новейших достижений в области масс-спектрометрической технологии позволяет достигать бескомпромиссных аналитических результатов с высочайшей чувствительностью в широчайшем диапазоне концентраций.

ITQ — трехмерная ионная ловушка, позволяющая работать в режиме MSⁿ, разработанная для широчайшего диапазона применений от рутинного ГХ/МС анализа до исследовательского уровня, удовлетворяет всем аналитическим потребностям лаборатории сегодня и обеспечивает ясные перспективы на модификацию прибора в том случае, если лаборатории потребуется расширить аналитические возможности.

TSQ QUANTUM GC — тройная квадрупольная МС/МС система, определяет новый стандарт качества в ГХ-МС/МС для лабораторий, занятых контролем качества пищевых продуктов, объектов окружающей среды, фармацевтических продуктов, в криминалистических, допинговых и клинических лабораториях.

Газовые хроматографы — масс-спектрометры сегодня являются приборами, широко используемыми в самых различных применениях — от криминалистического анализа до анализа пищевых продуктов на их безопасность.

Широчайший диапазон масс-спектрометрического оборудования от Thermo Fisher Scientific включает ряд моделей масс-спектрометров, ис-

МС-АНАЛИТИКА

TEXTRONICA AG

www.textronica.com

+7 (495) 995 88 90

+7 (495) 937 96 33

МС-АНАЛИТИКА

TEXTRONICA AG

www.textronica.com

+7 (495) 995 88 90

+7 (495) 937 96 33

пользуемых для анализа биологических объектов и соединений с большими молекулярными массами.

MSQ Plus — высокопроизводительный квадрупольный масс-спектрометр для соединения с любыми системами жидкостной хроматографии.

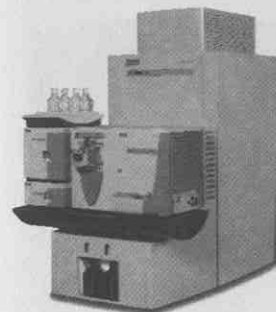
LCQ FLEET — новейший представитель самых распространенных в мире масс-спектрометров для жидкостной хроматографии серии LCQ — трехмерная ионная ловушка. Этот прибор прост в использовании и способен приносить максимум информации за минимальное время и при минимальных расходах образца.

TSQ QUANTUM ACCESS MAX — новая передовая аналитическая система на базе тройного квадрупольного анализатора для использования метода ВЭЖХ-МС/МС, в особенности, в анализе объектов окружающей среды и для безопасности продуктов питания. Эта система включает инновационный режим сканирования, зависящего от данных с продвинутыми возможностями количественного анализа.

LXQ — линейная квадрупольная ионная ловушка. Этот масс-спектрометр предназначен для любых аналитических применений, но наиболее продуктивен для разработки новых лекарственных средств, контроля качества в фармацевтике, протеомике, метаболомике, клинических применений, комбинаторной химии, в анализе продуктов натурального происхождения, в токсикологии и криминалистике.

LTQ VELOS — самый быстрый и самый чувствительный масс-спектрометр ионная ловушка в мире. Линейная ионная ловушка с двойной камерой давления обеспечивает аналитика продвинутыми возможностями при анализе образцов сложных смесей. Используется в качестве первого масс-спектрометра в наиболее мощных гибридных системах **LTQ FT ULTRA** и **LTQ ORBITRAP VELOS**.

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR



Диапазон масс:
от 50 до 4000 а.е.м.;

Разрешение:
100000 по иону m/z 400
при 1 скане в секунду;
> 750000 по иону m/z
400 при меньшей
скорости сканирования;

**Точность определения
масс:**

< 1,2 ppm с внешней
калибровкой;
< 1 ppm с внутренней
калибровкой;

Чувствительность:
Аттомоли для пептидов;

**Динамический диапазон
внутри одного
сканирования:**
> 4000

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

LTQ FT Ultra™

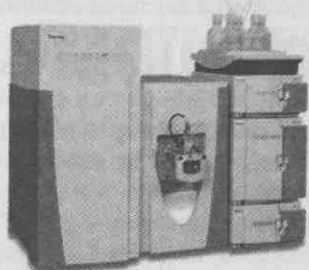
Гибридный масс-спектрометр ионно-циклотронного резонанса со сверхпроводящим магнитом.

LTQ FT Ultra - это гибридный прибор, в котором комбинируются наиболее продвинутые технологии линейной сегментированной квадрупольной ионной ловушки и ионноциклотронного резонанса с Фурье-преобразованием для достижения высочайшей аналитической мощности и гибкости.

LTQ FT Ultra является самым лучшим выбором прибора для наиболее сложных аналитических применений в изучении метаболизма, анализе белков, в том числе в «top-down» протеомике, разработке новых лекарственных средств и других применений, требующих сложных структурных исследований.

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ



Exactive™

Настольный масс-спектрометр высокого разрешения для ВЭЖХ.

Разрешение:

до 100000 при частоте сканирования 1 Гц;

Скорость сканирования:

до 10 сканов в секунду;

Диапазон масс:

50 - 4000 а.е.м.;

Ионизация в электроспрее ESI:

При петлевом вводе 500 фг бупирона соотношение сигнал/шум лучше чем 10:1 для масс-спектрограммы по массе $[M+H]^+$ иона с m/z 386,2551 а.е.м.;

Точность определ. масс:

< 5 ppm с внешней калибровкой;
< 2 ppm с внутренней калибровкой;

Thermo Fisher Scientific представляет новую эру настольных масс-спектрометров высокого разрешения Exactive™, построенных на базе орбитальной ловушки Orbitrap™. Высокое разрешение, точное определение массы, быстрое сканирование делают этот прибор идеальным как для скрининга компонентов в сложных смесях, так и при исследованиях, требующих предельной точности анализа.

Простое и удобное программное обеспечение Xcalibur™ плюс широкий спектр дополнительных программных пакетов (EnviroLab™, QuanLab™, ToxLab™) и библиотек масс-спектров гарантируют комфортную работу при решении любых поставленных задач.

Быстрое переключение между положительными и отрицательными ионами;

www.textronica.com
+7 (495) 995 88 90
+7 (495) 937 96 33

МС-АНАЛИТИКА
TEXTRONICA AG

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ



TSQ VANTAGE™

Настольный тройной квадрупольный ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения.

Диапазон масс:

10-1500 а.е.м. (TSQ Vantage, TSQ Vantage AM)
10-3000 а.е.м. (TSQ Vantage EMR);

Разрешение:

7500 (FWHM) на массе 508 а.е.м.;

Чувствительность:

5 мкл раствора резерпина с концентрацией 100 фг/мкл при скорости потока 500 мкл/мин при ионизации HESI и APCI;

Точность измерения массы:

не хуже 5 ppm;

Переключение полярности:

95 мс;

Thermo Scientific TSQ Vantage™: - тройной квадрупольный масс-спектрометр, обеспечивающий максимальную точность измерения масс и высочайшую чувствительность.

TSQ Vantage соединяет в себе достоинства ионной оптики G2 с надежностью и эффективностью источников Ion Max™. Технология детектирования с высоковольтным конверсионным диодом и высокоэффективные источники атмосферной ионизации дают возможность получить самый чувствительный тройной квадрупольный масс-спектрометр в мире.

Простое и удобное программное обеспечение Xcalibur™ плюс широкий спектр дополнительных программных пакетов гарантируют комфортную работу при решении любых поставленных задач.

МС-АНАЛИТИКА
TEXTRONICA AG

www.textronica.com
+7 (495) 995 88 90
+7 (495) 937 96 33

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ



TSQ Quantum Access MAX™

Тройной квадрупольный
ВЭЖХ-МС/МС

Диапазон масс:
от 10 до 3000 а.е.м.;

Чувствительность:
10 мкл раствора резерпина
с концентрацией 100 фг/мкл
при скорости потока 500
мкл/мин при ионизации в
HESI;

При высоком разрешении:

Режим SRM с разрешением
на Q1 0.4 а.е.м. и Q3 0.7
а.е.м. на полувысоте
(FWHM): отношение
сигнал/шум не менее 50:1
при переходе от
молекулярного протони-
рованного иона с m/z 609.3
а.е.м. к фрагментному иону
с m/z 195.1 а.е.м.;

Скорость сканирования:
5000 сканов в секунду;

**Thermo Scientific TSQ Quantum
Access™** - тройной квадрупольный масс-
спектрометр, обладающий всеми
характеристиками, необходимыми для
высококачественных исследований при
анализе объектов окружающей среды и
продуктов питания - чувствительностью и
селективностью, широким диапазоном
масс и высоким разрешением.

Простое и удобное программное
обеспечение Xcalibur™ плюс широкий
спектр дополнительных программных
пакетов гарантируют комфортную работу
при решении любых поставленных задач.

Дополнительные опции программного
обеспечения для качественного и
количественного анализа (TraceFinder™,
QuickQuan™, QuickCalc™, MetWorks™,
Mass Frontier™).

МС-АНАЛИТИКА
TEXTRONICA AG

www.textronica.com
+7 (495) 995 88 90
+7 (495) 937 96 33

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ



Surveyor Plus™

Модульная система высокоэффектив-
ной жидкостной хроматографии.

Surveyor MS/LC Pump

Четырехкомпонентный
градиентный насос, с
интегрированным
вакуумным дегазатором и
демпфером обеспечивает
воспроизводимый градиент
(±1%) даже при скоростях
потока в диапазоне от 0.1
до 10000 мл/мин и
великолепную стабильность
базовой линии для
достижения максимальной
чувствительности и
точности количественного
анализа.

Surveyor Autosampler

-новая технология ввода
пробы без потерь;
-колоночный термостат;

-возможность предколоночной
derivatization;

-камера на 200 виал с температурным
контролем с возможностью установки
трех микролуночных пластин;

-стандартная петля на 25 мкл с
возможной установкой других петель и
других шприцов;

Surveyor PDA

-использование патентованной технологии
LightPipe™ с длиной оптического пути
50мм для большей чувствительности;
- 512 диодная матрица;

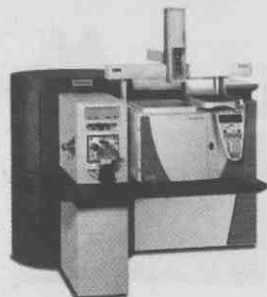
При работе с любыми детекторами
(Thermo Fisher Scientific или других
производителей) может использоваться
программное обеспечение ChromQuest™
с дружественным интерфейсом.

МС-АНАЛИТИКА
TEXTRONICA AG

www.textronica.com
+7 (495) 995 88 90
+7 (495) 937 96 33

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ



DFS™

Хромато-масс-спектрометр
высокого разрешения.

Диапазон масс:

1200 а.е.м. при полном
ускоряющем напряжении;

Скорость сканирования:

от 0.1 до 50 с на декаду
массовых чисел;

Разрешение:

60000;

Точность определения масс:

< 2 ppm;

Чувствительность по 2,3,7,8-TCDD:

При вводе 100 фг чистого
2,3,7,8-TCDD система
обеспечивает сигнал/шум
не менее 800:1 на массе
321.8937; Широкий выбор
режимов ионизации,
включая бомбардировку
быстрыми атомами, хими-
ческую ионизацию с
использованием двух
газов-реагентов;

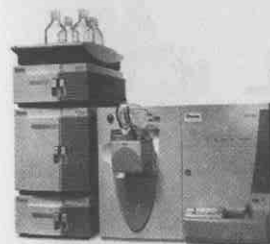
Thermo Fisher Scientific представляет
ГХ/МС высокого разрешения. DFS™ – это
масс-спектрометр высокого разрешения с
двойной фокусировкой, сменивший МАТ
9XX. Хромато-масс-спектрометр высокого
разрешения с двойной фокусировкой
DFS™ – это компактная система ГХ/МС,
способная с полной достоверностью
проводить сверхчувствительный целевой
анализ компонентов в любых
применениях, в особенности при
детектировании экотоксикантов, таких как
диоксин, или спортивных допингов. DFS™ –
это магнитный хромато масс спектрометр
с непревзойденными характеристиками,
при этом он настолько прост в
эксплуатации, что аналитик не заметит
разницы с настольным прибором.
ГХ/МС может работать без присутствия
оператора. Программное обеспечение для
количественного анализа диоксинов;

МС-АНАЛИТИКА
TEXTRONICA AG

www.textronica.com
+7 (495) 995 88 90
+7 (495) 937 96 33

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ



LCQ FLEET

Настольный масс-спектрометрический
детектор ионная ловушка для ВЭЖХ.

Диапазон масс:

15 - 200 а.е.м.
50 - 2000 а.е.м.
200 - 4000 а.е.м.;

Разрешение:

В режиме ZoomScan™
ширина пика масс-спектра
на полувывоте до 0.3
(FWHM);

МС эксперименты:

от 1 до 10 в полностью
автоматическом режиме;

Чувствительность (ESI):

Петлевой ввод 2 мкл
раствора резерпина 1
пг/мкл в смеси изопропа-
нол/вода S/N = 100:1 при
переходе от иона с m/z
609 а.е.м. к двум дочер-
ным ионам с m/z 397 и
448 а.е.м. при единичном
разрешении;

Thermo Fisher Scientific
представляет прибор для
ВЭЖХ/МС/МС с рекордной
чувствительностью и широчайшими
возможностями анализа в областях
протеомики, клинического анализа,
разработки и анализа лекарственных
средств, исследованиях метаболизма,
химической промышленности.

Простое и удобное программное
обеспечение Xcalibur™ плюс широкий
спектр дополнительных программных
пакетов (EnviroLab™, QuanLab™,
ToxLab™) и библиотек масс-спектров
гарантируют комфортную работу при
решении любых поставленных задач.

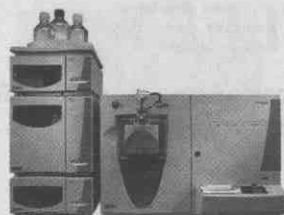
Позволяет проводить исследования в
режимах положительной и
отрицательной ионизации.

МС-АНАЛИТИКА
TEXTRONICA AG

www.textronica.com
+7 (495) 995 88 90
+7 (495) 937 96 33

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ



LTQ XL и LXQ

Масс-спектрометрические
детекторы квадрупольная линейная
ловушка для ВЭЖХ.

Диапазон масс:

15 - 200 а.е.м.
50 - 2000 а.е.м.
200 - 4000 а.е.м.;

МСⁿ эксперименты:

от 1 до 15 (10 для LXQ)
в полностью
автоматическом режиме;

Разрешение:

До 0.05 FWHM (ширина
пика на полувысоте) в
режиме сканирования
UltraZoom Scan;

Чувствительность (ESI):

Петлевой ввод 2 мкл
раствора резерпина 125
фг/мкл в потоке 400
мкл/мин элюента
изопропанол/вода
соотношение сигнал/шум
не хуже 100:1;

LTQ XLTM и LXQTM –
высокопроизводительные линейные
ионные ловушки с великолепными
характеристиками для современной
аналитической лаборатории. Высокая
чувствительность, быстрый аналитический
цикл, простота эксплуатации позволяют
легко, надежно и точно проводить
идентификацию при скрининге
лекарственных средств, анализе пептидов
и белков, пестицидов, допинговых средств,
а также во многих других случаях.

LTQ XL - сегментированная ловушка с
радиальным выбросом ионов и удвоенной
системой детектирования
Простое и удобное программное
обеспечение XcaliburTM плюс широкий
спектр дополнительных программных
пакетов (EnviroLabTM, QuanLabTM,
ToxLabTM) и библиотек масс-спектров
гарантируют комфортную работу при
решении любых поставленных задач.

МС-АНАЛИТИКА
TEXTRONICA AG

www.textronica.com
+7 (495) 995 88 90
+7 (495) 937 96 33

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ



ACCELA

Жидкостной хроматограф высокого
и сверхвысокого давления.

ACCELA PumpTM

Скорость потока: 1.0 – 1000
мкл/мин;
Точность установления
потока: 0.1 мкл/мин;
Макс. давление: 1000 атм.;
Точность градиента:
± 1% при скорости потока
от 25 до 500 мкл/минж;

ACCELA PDA DetectorTM

Диапазон длин волн:
190–800 нм с инкр. 1 нм;
Точность длин волн: ± 1 нм
на 254 нм и 640 нм;
Разрешение по длинам
волн: 1.2 нм;
Нелинейность поглощения:
< 5% при 2.0 AU на 256 нм
Диапазон поглощения: от –
2.0 до + 4.0 AU;

Новый сверхвысокоэффективный
жидкостный хроматограф **ACCELATM**
способен работать в широчайшем
диапазоне скоростей потоков и давлений,
обеспечивая как типичное для ВЭЖХ
разделение на обычных колонках, так и
сверхбыстрое и эффективное разделение
на колонках с размером частиц сорбента
менее 2мкм при сверхвысоких давлениях.

Колонки для работы в режиме
сверхвысокоэффективной хроматографии
с размером зерна 1.9 мкм и уникальными
специально разработанными и
патентованными **Thermo Fisher Scientific**
фазами справляются с аналитическими
задачами любой сложности.

Простое и удобное программное
обеспечение XcaliburTM или ChromQuestTM
гарантируют комфортную работу при
решении любых поставленных задач.

МС-АНАЛИТИКА
TEXTRONICA AG

www.textronica.com
+7 (495) 995 88 90
+7 (495) 937 96 33

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ



TSQ Quantum GC™

Тройной квадрупольный ГХ-МС/МС.

Диапазон масс:
от 10 до 3000 а.е.м.;

Скорость сканирования:
до 5000 а.е.м./сек, свыше
300 SRM переходов в сек;

Чувствительность (EI):
1 мкл октафторнафталина
в изооктане 1 пг/мкл S/N=
100/1 для m/z 272 а.е.м.
режим SIM;

Чувствительность (CI):
1 мкл октафторнафталина
в изооктане 1 пг/мкл S/N=
1000/1 для m/z 272 а.е.м.
отрицательные ионы, SRM;
1 мл бензофенона в н-
гептане 2 пг/мкл S/N =
200:1 при переходе от m/z
183 а.е.м. к m/z 105 а.е.м.
отрицательные ионы,
полное сканирование;

TSQ Quantum GC™ от Thermo Fisher Scientific устанавливает новые стандарты качества для ГХ МС/МС анализа в широком круге применений: анализе объектов окружающей среды, безопасности пищевых продуктов, фармацевтике, клиническом анализе и исследованиях, криминалистике и допинговом анализе.

Тройной квадрупольный масс-анализатор с газовым хроматографом Trace GC Ultra™ расширяет возможности широко известной и успешной серии масс-спектрометров TSQ™.

Вакуумный шлюз для быстрого переключения режимов ионизации – EI, CI, а также для легкого перехода от работы с ГХ к прямому вводу без демонтажа хроматографа.

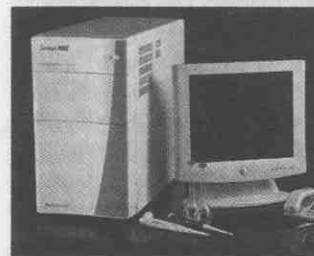
Возможно подключение автоинжекторов и парофазных автодозаторов;

МС-АНАЛИТИКА
TEXTRONICA AG

www.textronica.com
+7 (495) 995 88 90
+7 (495) 937 96 33

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ



MSQ™ Plus

Настольный квадрупольный
ВЭЖХ/МС детектор

Диапазон масс:
от 17 до 2000 а.е.м.;

Скорость сканирования:
до 5000 а.е.м./сек, свыше
300 SRM переходов в сек;

Чувствительность (ESI):
Положительные ионы.
При инъекции 10 мкл
раствора эритромицина [C]
= 5 пг/мкл отношение
сигнал/шум на m/z 734.5
а.е.м. составляет 1000:1;
Отрицательные ионы. При
инъекции 10 мкл
раствора п-нитрофенола с
[C] = 2 пг/мкл отношение
сигнал/шум на m/z 138
составляет 500:1;

Квадрупольный ВЭЖХ/МС **MSQ Plus** – это лучший выбор для вашей лаборатории. **MSQ Plus** – самый компактный, исключительно надежный, простой и легкий в применении и обслуживании, обладает потрясающими для своего размера аналитическими характеристиками, при этом стабилен и долговечен.

Простое и удобное программное обеспечение Xcalibur™ плюс широкий спектр дополнительных программных пакетов (EnviroLab™, QuanLab™, ToxLab™) и библиотек масс-спектров гарантируют комфортную работу при решении любых поставленных задач.

MSQ Plus комплектуется высокоэффективными жидкостным хроматографом **SURVEYOR LC** или сверхвысокоэффективным **ACCELA**.

Может также соединяться с ВЭЖХ других производителей;

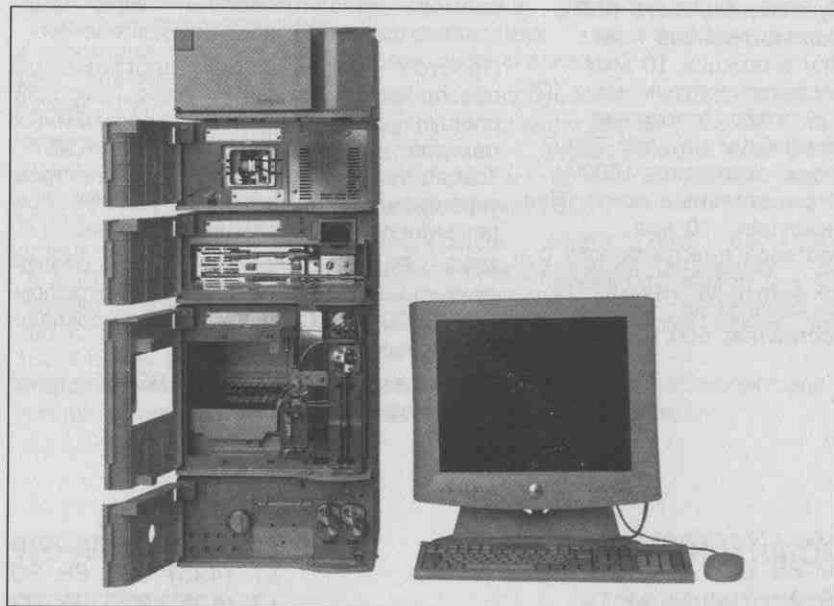
МС-АНАЛИТИКА
TEXTRONICA AG

www.textronica.com
+7 (495) 995 88 90
+7 (495) 937 96 33

LaChrom Elite — решение Hitachi High Technologies для высокоэффективной жидкостной хроматографии

*Компания ГалаХим — официальный дистрибутор
Hitachi High Technologies в России*

Корпорация Hitachi (Япония) выпускает приборы для ВЭЖХ уже более 25 лет, и в каждом поколении приборов включены все новейшие достижения аналитического приборостроения, оригинальные разработки фирмы при сохранении традиционно высокого качества японских приборов. Выпускаемая сегодня линейка приборов LaChrom Elite включила в себя все достижения и удачные решения предыдущих моделей (LaChrom и LiChrograph) и новейшие разработки. Модульная компоновка позволяет подобрать конфигурацию прибора в соответствии с аналитическими задачами, при этом оставляя возможность быстрого изменения конфигурации при установке новых блоков и узлов, а компоновка блоков в виде башни позволяет максимально экономить занимаемую прибором лабораторную площадь. Минимальная конфигурация прибора может включать только насос, ручной инжектор и детектор (и систему обработки данных), в более сложных конфигурациях могут использоваться автосамплер (в т.ч. с охлаждением проб), термостат колонок (с возможностью охлаждения ниже температуры помещения), автоматический кран-переключатель колонок и несколько детекторов в зависимости от решаемых задач.



Уникальные детекторы. Приборы LaChrom Elite могут комплектоваться новым диодно-матричным детектором L-2455 с уникально высокой чувствительностью, сравнимой с очень хорошим УФ-детектором (шумы $\leq 2 \cdot 10^{-6}$ OE). В количественном анализе он может быть использован как мультиволновой спектрофотометрический детектор без механических элементов переключения длин волн в ходе измерения. Новый флуориметрический детектор L-2485 показывает высочайшую чувствительность, пригодную для детектирования минимальных следовых количеств (соотношение сигнал/шум для Рамановского пика воды более 900).

От микро до стандартной и скоростной ВЭЖХ. LaChrom Elite обеспечивает оптимальное хроматографическое разрешение при скоростях потока элюента от 0,05 до 10 мл/мин, с использованием обычных и микроколонок с внутренним диаметром 1, 2, 3, 4 и 4,6 мм. Применение монолитных колонок Chromolith® (Merck). (вн. диам. 3 или 4,6 мм) для скоростной хроматографии с потоком элюента 1–10 мл/мин позволяет резко сократить время анализа (в 3–10 раз) по сравнению с обычными колонками.

ЖХ-МС системы. Хроматографы серии LaChrom Elite могут стыковаться с масс-спектрометрическими детекторами Bruker Daltonics: ионными ловушками серий esquire™ и HCT™, а также времяпролетными micrOTOF™, которые позволяют детектировать массы молекул, изучать структуру и идентифицировать вещества в рутинных и исследовательских работах. Прибор и детектор полностью контролируются с помощью ПО Compass®/HyStar® Bruker Daltonics.

Удобный и компактный дизайн. Все блоки серии LaChrom Elite выпускаются в унифицированных корпусах, собираемых в единую «башню» при необходимости. Дополнительные узлы и аксессуары (дегазатор, устройства создания градиента, охлаждение проб в автосамплере и краны-переключатели) компактно и удобно монтируются внутри блоков. Дизайн прибора предусматривает максимальный доступ пользователя ко всем узлам прибора с фронтальной стороны для подготовки к работе (установка колонок, проб в автосамплер) и для проведения осмотра, планового обслуживания насосов и детекторов, а также для быстрой переналадки системы.

Безопасность и надежность. Для обеспечения безопасной работы всего персонала лаборатории, устойчивости и предотвращения поломок, хроматографы серии LaChrom Elite снабжены датчиками утечек растворителя во всех блоках и предусматривают автоматические процедуры обработки возможных сбоев и ошибок. Бутыли с элюентом помещены в надежный органайзер, который также включает блок низковольтного (24 В) питания для большинства модулей прибора, чтобы минимизировать количество кабелей и повысить электробезопасность.

Контроль прибора с помощью ПО. Все блоки серии LaChrom Elite предназначены для работы в составе автоматизированных приборов под управлением ПО EZChrom Elite (а также Empower и др.). Контрольно-управляющие панели ко всем блокам поставляются как дополнительная

опция, если Вы хотите поддерживать «ручное» управление или независимую работу в составе других приборов либо в минимальной конфигурации. Также по желанию можно установить платы вывода аналогового сигнала с детекторов для стыковки с иными хроматографическими системами, системами обработки данных (интеграторами, самописцами и т.д.). Блоки прибора связываются с помощью коммуникационной системы E-line (общая цифровая шина) с быстрой передачей данных на компьютер через USB-интерфейс.

Функции GXP. Все модули LaChrom Elite поддерживают требования стандартов GLP и GMP. Встроенные в каждый модуль микропрограммы записывают log-файлы с учетом времени работы сменных частей, результатов встроенной диагностики. Фотометрические детекторы укомплектованы дополнительной ртутной лампой для автоматической калибровки шкалы длин волн. Полная запись журнала GXP-функций возможна при работе с ПО EZChrom, автоматически регистрирующим все параметры работы и протоколы тестирования блоков.

Насосы L-2130 могут быть использованы для изократического разделения, в режиме градиента низкого давления (4 растворителя в 1 насосе) или градиента высокого давления (2 или 3 насоса). Улучшенная схема двигателя расширяет диапазон скорости подачи с точностью $\pm 2\%$ до 8,0 мл/мин. Данный насос устойчиво работает в диапазоне скоростей потока от 0,05 до 9,99 мл/мин, а при установке специальных микроголовок — 0,001–2,0 мл/мин.

Улучшение точности подачи и воспроизводимости времени удерживания в градиентном режиме достигается с помощью синхронизации момента инъектирования автосамплера с двигателем насоса. При работе в режиме градиента высокого давления дополнительные субсенсоры давления устанавливаются на каждый из насосов, т.е. всего используется четыре/шесть сенсоров. Это полностью исключает интерференцию пульсаций.

Проточный вакуумный дегазатор устанавливается внутри модуля насоса. Это обеспечивает компактную конфигурацию системы, легкость обслуживания и контроля.

Автосамплер L-2200 предназначен для эффективной и надежной автоматизации анализа. В нем применяется метод прямой инъекции — игла для внесения образцов во время инъекции является частью проточной системы. Поскольку образец, забранный в иглу, может быть внесен полностью в проточную систему, минимальный дозируемый объем может быть всего лишь 7 мкл, что особенно важно для измерений редких образцов или следовых количеств. Игла промывается с внешней стороны до и после инъекции, что минимизирует степень переноса анализируемых веществ из одной пробы в другую.

Дополнительный датчик проверяет наличие виалы с образцом для предотвращения забора воздуха и внесения его в систему. Это обеспечивает высокую надежность работы автосамплера. Дополнительно могут уста-

навливаться различные штативы для проб, в том числе для большого количества образцов — в стандартный штатив можно установить до 200 виал по 1,5 мл и до трех микропланшет (382 лунки), что позволяет проводить одновременные измерения до 1152 образцов.

Термостат колонок L-2300 имеет функцию охлаждения в стандартной конфигурации, что позволяет контролировать диапазон температур от «окружающая температура — 15 °C» до 65 °C и вмещает до трех колонок длиной до 250 мм. Симметрия и острота хроматографических пиков сильно зависят от эффективности термостата колонки, а также от эффективности колонки и скорости потока растворителя. В термостате L-2300 для нагрева/охлаждения колонки используется метод нагрева/охлаждения циркулирующего воздуха, а для предварительного нагрева элюента до колонки используется метод контактного нагрева/охлаждения капилляра. Эта комбинация двух методов улучшает симметрию и остроту пиков.

Прозрачная передняя крышка позволяет проверить внутреннюю часть термостата с закрытой крышкой. Таким образом можно проверить наличие утечек жидкости и наблюдать состояние колонки без побочного воздействия на температурный режим колонок в термостате. В качестве опции в термостат колонок L-2300 можно установить трехколоночный кран-селектор, позволяющий выбирать любую из трех колонок для каждого из аналитических измерений. Используя несколько колонок, можно получать данные анализа по нескольким методикам в автоматическом режиме (круглосуточная работа). Расширенная модель термостата L-2350 позволяет установить до 8 колонок длиной до 400 мм, поддерживая температуру до 85 °C высокой точностью и однородностью по всему объему.

УФ-Детектор L-2400/УФ-ВИД Детектор L-2420 обеспечивают чрезвычайно низкий уровень шумов $6 \cdot 10^{-6}$ ОЕ, что необходимо для высокой чувствительности. Улучшенная стабильность также обеспечивает надежность анализа вне зависимости от условий окружающей среды. В блок детектора встроена ртутная лампа для проверки точности длины волны. Используя линию эмиссии ртути 254 нм, можно осуществить проверку часто используемой в жидкостной хроматографии длины волны.

Диодно-матричный детектор L-2455 использует в качестве источника света дейтериевую и вольфрамовую лампы для измерения поглощения света в широком диапазоне длин волн 190–900 нм. 1024-битная диодная матрица обеспечивает лучшее спектральное разрешение и улучшает идентификацию компонентов по УФ-спектрам. В сравнении с «традиционным» детектором улучшено соотношение сигнал/шум.

Флуориметрический детектор L-2485 сконструирован с использованием новых дифракционных решеток, обеспечивающих меньшую потерю света и высокую чувствительность флуоресцентных измерений. Дополнительная ртутная лампа предназначена для автоматической калибровки длин волн. Значительно облегчены замена лампы и очистка проточной ячейки — они расположены на фронтальной части детектора.

Рефрактометрический детектор L-2490 предназначен для измерений, основанных на разнице коэффициентов преломления элюента и образца. Наиболее часто используется для анализа высокомолекулярных соединений и полисахаридов. Обеспечиваются цифровой вывод сигнала, более короткое время стабилизации, чем в старых моделях, возможны различные температурные режимы измерительной кюветы.

Организатор L-2000 предназначен для установки бутылей с растворителями, а также как блок электропитания 24 В двух насосов, автосамплера и УФ-детектора.

Новая ВЭЖХ система Hitachi LaChrom Elite обеспечит эффективный, высокоскоростной и высокоточный анализ многочисленных образцов в службе контроля качества предприятия, в научной и технологической лаборатории, центре сертификации, службе экологического контроля — везде, где может быть применен метод жидкостной хроматографии.

Жидкостные хроматографы «Стайер»: этапы создания и современный взгляд

Более 15 лет компания «АКВИЛОН» разрабатывает и производит хроматографические системы «Стайер». Изначально системы проектировались как инструменты, ориентированные на выполнение большого объема рутинных измерений. Сейчас — это высокоточное оборудование, производимое с использованием современных технологий и материалов в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 9001-2001.

Разработка и производство систем для ионной хроматографии были первым этапом развития хроматографического приборостроения в нашей компании. Ионный хроматограф «Стайер» используется для контроля ионного состава питьевых, природных и сточных вод, водных сред в тепловой и атомной энергетике, а также может применяться в других областях, где необходим контроль ионного состава водных сред. Основным модулем ионного хроматографа «Стайер» стал разработанный в компании детектор по электропроводности с оригинальным конструкторским решением аналитической кюветы с термостатированием. Это позволило обеспечить высокую чувствительность и низкие значения шума и дрейфа детектора. Детектор позволяет работать как с подавлением фоновой электропроводности, так и без подавления.

В конструкторском отделе компании был разработан уникальный капиллярный подавитель, принцип действия которого основан на непрерывном удалении катионов натрия из подвижной фазы, протекающей через специальный капилляр, обладающий селективной ионной проводимостью. Через стенку капилляра происходит процесс ионного обмена с регенерирующим раствором. Катионы натрия переносятся в регенерирующий раствор, на их место поступают сольватированные ионы водорода с образованием слабо диссоциирующего соединения, что приводит к резкому снижению электропроводности элюента. Малый «мертвый» объем подавателя (менее 150 мм³) по сравнению с объемом стандартной подавательной колонки (около 1500 мм³) существенно уменьшает размывание пиков анализируемых анионов и приводит к росту чувствительности анализа. Для повышения эффективности обмена, снижения «мертвого» объема и обеспечения оптимальной линейной скорости элюента капилляр заполнен сферическим сорбентом — катионообменником большой обменной емкости. Действующей силой ионного обмена является разница концентраций ионов натрия в подвижной фазе и сольватированных ионов водорода в регенерирующем растворе.

В 2007 году был разработан электромембранный подавитель фоновой электропроводности, позволяющий освободить специалиста от необходимости менять регенерирующий раствор серной кислоты через каждые 4–5 литров прокачиваемого элюента (не более). Принцип действия электромембранного подавателя заключается в непрерывном удалении катио-

нов под действием электрического поля из элюента, протекающего через специальный щелевой электродиализный модуль. В результате катионы элюента переносятся во внешнюю (катодную) проточную камеру модуля и сбрасываются в слив.

Элюентная камера модуля представляет собой щелевую камеру, ограниченную с двух сторон катионообменными мембранами. На катионообменные мембраны со стороны регенерирующих камер нанесены электропроводящие пористые слои инертного металла, обеспечивающие электромиграционный перенос ионов. Мембраны с нанесенными пористыми слоями металла представляют собой мембранно-электродные блоки. При наложении на них электрического поля катионы элюента удаляются из элюента в катодную регенерирующую камеру. Одновременно из анодной регенерирующей камеры в элюентную камеру переносится эквивалентное количество ионов водорода, что обеспечивает электронейтральность процесса переноса. Катионообменные мембраны препятствуют электромиграционному переносу анионов из элюентной камеры. Элюент на выходе из электромембранного модуля представляет собой либо воду (при использовании раствора гидроксида натрия или калия), либо раствор углекислого газа в воде (при использовании карбонат-бикарбонатного элюента), либо раствор слабодиссоциирующей кислоты (например, раствор борной кислоты при использовании тетраборатного элюента). Во всех случаях наблюдается существенное снижение электропроводности элюирующего раствора и, соответственно, увеличение хроматографических пиков определяемых анионов при кондуктометрическом детектировании. Устройство имеет патенты Российской Федерации и Германии. Встраивается в ионные системы практически любых производителей.

Огромное преимущество данного устройства — возможность работы с любым типом элюента (не только карбонатным, но и щелочным). Отсутствие регенерирующего раствора позволяет получить отсутствие дрейфа и снять ограничение по времени работы.

Компания «АКВИЛОН» более 10 лет производит изократические хроматографы «Стайер» со спектрофотометрическим, флуориметрическим и рефрактометрическим детекторами.

Спектрофотометрический детектор UVV104 рассчитан на работу в ультрафиолетовой/видимой областях спектра (190–600 нм). Прибор постоянно модифицируется, улучшаются его технические и пользовательские параметры. Сейчас с помощью таймерной программы детектор может работать в режиме автоматической смены длин волн в процессе анализа; в детекторе установлен счетчик часов работы лампы.

Возможность производить замену кюветы (от микро- до препаративной) позволяет широко использовать детектор в разных областях хроматографии, встраивая в системы других производителей.

С 2010 года компания «АКВИЛОН» параллельно со старой модификацией флуориметрического детектора модели 121, имеющего светодиод

с одной длиной возбуждения, начинает выпуск модели 121М с 2 светодиодами. Дополнительно по выбору устанавливаются светодиод на 280 нм или 255 нм. Спектральный диапазон измерений выбирается либо узкий 330–400 нм, либо широкий 400–600 нм. Данные модификации позволяют более широко использовать детектор. В частности, увеличивается на порядки чувствительность определения некоторых полиароматических углеводородов в объектах окружающей среды, а также части контролируемых токсикантов в продовольственном сырье.

В рефрактометрическом детекторе модели 102 применена трехходовая кювета, в которой преломление образца происходит дважды в противоположных направлениях. В результате для подвижных фаз с различными показателями преломления не требуется дополнительной подстройки луча на дифференциальном светодиоде. Благодаря двойному преломлению во взаимно противоположных направлениях детектор регистрирует только показатель преломления образца, нивелируя изменение показателя преломления подвижной фазы в каналах сравнения. Следствием двойного преломления является нечувствительность рефрактометра к текущему значению температуры, определяющим фактором является равномерность температуры по объему кюветы. Детектор широко используется в хроматографических системах при исследовании состава нефтепродуктов, фракционного состава полимеров, спиртов и углеводов в пищевых продуктах, продовольственного и растительного сырья.

Компания «АКВИЛОН» уделяет большое внимание производству вспомогательных хроматографических модулей, позволяющих повысить чувствительность анализа и улучшить разделение. Так были разработаны и изготавливаются in-line дегазатор и термостат колонок.

Модуль дегазации имеет 2 независимых канала, подключается в гидравлические линии, в результате физических процессов в рабочих камерах дегазатора освобождает элюирующие агенты от растворенных газов.

Термостат колонок (твердотельный, температура колонки поддерживается путем теплопередачи через фиксатор колонки и станину) производится двух модификаций: без инжектора и с инжектором. Соответственно, температура нагрева в термостате с инжектором ограничивается техническими требованиями к инжектору — до 80 °С. Термостаты рассчитаны на установку двух колонок. Заданный нагрев постоянно регулируется контроллером.

Все модули хроматографа «Стайер» управляются как с панелей самих блоков, так и с помощью программного обеспечения.

Сервисная служба компании, состоящая из высокопрофессиональных специалистов, обеспечивает постоянную и мобильную консультативную поддержку по всем вопросам, касающимся технической и эксплуатационной поддержке пользователей. Осуществляет ввод в эксплуатацию хроматографа по месту установки, а также обеспечивает постгарантийное обслуживание устройства, его ремонт и работу по подготовке к поверке с выездом сервис-инженера к пользователю.

Компания «АКВИЛОН» уделяет особое внимание методическому сопровождению выпускаемых приборов. В научно-исследовательском центре компании были разработаны 25 методик выполнения измерений (МВИ) с использованием метода ВЭЖХ. Данные методики содержат современный подход к подготовке проб методом твердофазной экстракции для контроля показателей безопасности и качества: содержания бенз(а)-пирена в различных объектах (воде, воздухе, почве, продуктах питания); микотоксинов (афлатоксинов, зеараленона, дезокиниваленола, охратоксина А) в пищевых продуктах, в т.ч. зерновых, а также содержания витаминов, органических кислот, углеводов и других веществ.

В лабораториях природоохранных центров широко используются как наиболее простые и воспроизводимые методики одновременного определения 6 анионов (фторида, хлорида, нитрита, нитрата, фосфата и сульфата), катионов лития, калия, натрия, аммония, магния и кальция.

МВИ прошли метрологическую аттестацию и внесены в Федеральный реестр методик, допущенных для выполнения измерений, применяемых в сферах распространения государственного метрологического контроля и надзора.

Работая на российском рынке много лет, компания «АКВИЛОН» обеспечивает необходимый для успешной работы любой лаборатории уровень технической и методической поддержки, снабжает заказчиков расходными материалами. Так с 1998 года компания является официальным дистрибьютером компании «PHENOMENEX» (США) в России, Белоруссии, Украине и Казахстане. Компания «PHENOMENEX» — один из мировых лидеров по разработке и производству расходных материалов для хроматографии. Широкий спектр сорбентов позволяет подобрать высокоселективный сорбент практически для любой хроматографической задачи.

В учебном центре компании ежегодно проходят обучение более 250 сотрудников различных лабораторий. Специалисты испытательных лабораторий ЦСМ, ЦГиЭ, аналитических инспекций по охране окружающей среды, промышленно-санитарных лабораторий, ЦЗЛ, ЦККЛС могут пройти общий курс физико-химических методов анализа, в который входит обучение хроматографическому методу, а также специализированные курсы с получением по окончании Сертификата государственного образования. Программы обучения можно посмотреть на сайте www.analytech.ru.

Компания «АКВИЛОН» динамично развивается: разрабатывается хроматографическое оборудование нового поколения, совершенствуются испытанные многими годами эксплуатации и хорошо зарекомендовавшие себя более простые модели, разрабатываются новые методики и проводится их аттестация.

Компания «АКВИЛОН» надеется на продолжение успешного сотрудничества с нашими партнерами, а также на расширение наших контактов на основе взаимных творческих и коммерческих интересов.

в магазинах:

г. Москва

Торговый дом "Библио-Глобус", м. Лубянка, ул. Мясницкая, д.6
тел.: 781-19-00, 624-46-80

"Московский дом книги", м. Арбатская, ул. Новый Арбат, д.8
тел.: 789-35-91

"Дом технической книги", м. Ленинский проспект, Ленинский пр-т, д.40
тел.: 789-35-91

"Молодая гвардия", м. Полянка, ул. Б. Полянка, д.28
тел.: 238-50-01

"Дом книги на Ладужской", м. Бауманская, ул. Ладужская, д.8, стр.1
тел.: 267-03-01

"Дом Медицинской Книги", Комсомольский проспект, д.25
тел.: 789-35-91

ДК Фолиант, Ш. Энтузиастов, д. 60, к.1
тел.: 789-35-91

ДК Студент, Калужская пл., д.1, стр.1
тел.: 789-35-91

ДК Новый, Ш. Энтузиастов, д.24/43
тел.: 789-35-91

в городах России:

г. Санкт-Петербург

"Санкт-Петербургский дом книги", Невский пр., д.62

"Дом технической книги", Пушкинская пл., д.2

"Новая техническая книга", Измайловский пр., д.29

г. Екатеринбург

сеть магазинов "Дом Книги" <http://www.domknigi-online.ru>

г. Новосибирск

сеть магазинов "Топ книга" www.top-kniga.ru

г. Ростов-на-Дону

сеть магазинов "Магистр" <http://www.booka.ru>

наложенным платежом:

(заказы принимаются по e-mail, по почте)

по безналичному расчету:

(заказы принимаются по e-mail,
по факсу с указанием полных реквизитов юридического лица)

ИНФОРМАЦИЯ О НОВИНКАХ: www.technosphera.ru

ЗАКАЗ КНИГ: sales@technosphera.ru

Тел.: (495) 234-0110, факс: (495) 956-3346

РИЦ "ТЕХНОСФЕРА"



Заявки на книги присылайте по адресу:

125319 Москва, а/я 91

Издательство «Техносфера»

e-mail: knigi@technosphaera.ru

sales@technosphaera.ru

факс: (495) 956 33 46

В заявке обязательно указывайте
свой почтовый адрес!

Подробная информация о книгах на сайте
<http://www.technosphaera.ru>

Сычев Константин Сергеевич

**Практическое руководство
по жидкостной хроматографии**

Компьютерная верстка – В.В. Павлова

Дизайн – Д.С. Шилов

Дизайн книжных серий – С.Ю. Биричев

Корректор – М.Г. Емельянова

Выпускающий редактор – А.Ю. Филатова

Ответственный за выпуск – О.А. Казанцева

Формат 60х90/16. Печать офсетная.

Гарнитура Ньютон

Печ.л. 17. Тираж 5000 экз. (1-й завод 1500 экз.) Зак. №2090.

Бумага офсет №1, плотность 80 г/м².

Издательство «Техносфера»

Москва, ул. Краснопролетарская, д.16, стр. 2

Отпечатано в ООО ПФ «Полиграф-Книга»

160001 г. Вологда, ул. Челюскинцев, дом 3

HITACHI
Inspire the Next

Модульные ВЭЖХ системы

Спектрофотометры

Спектрофлюориметры

Аминокислотные анализаторы

Высочайшее качество и надежность,
широкий выбор, низкие цены.

Сделано в Японии



**Официальный дистрибьютор
Hitachi High-Technologies в России
ООО «ГалаХим»**

123100, Москва, ул. 2-я Звенигородская, 12
Тел/факс (495) 253-37-33, 253-39-33
Эл. почта hplc@galachem.ru www.galachem.ru



Химические реактивы
Все для хроматографии
Лабораторное оборудование и приборы
Фармацевтические и аналитические стандарты
Лабораторная мебель

МИР ХИМИИ

К. СЫЧЕВ

Практическое
руководство
по жидкостной
хроматографии

СЫЧЕВ КОНСТАНТИН СЕРГЕЕВИЧ –
ВЫПУСКНИК ХИМФАКА МГУ (2001 Г.),
К. Х. Н. (2004 Г.), АВТОР БОЛЕЕ
30 РАБОТ ПО ХИМИИ,
ОПУБЛИКОВАННЫХ
В РАЗЛИЧНЫХ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ
И МЕЖДУНАРОДНЫХ НАУЧНЫХ
ЖУРНАЛАХ

КНИГА ПРЕДЛАГАЕТ
НАЧИНАЮЩЕМУ СПЕЦИАЛИСТУ
ПОЭТАПНЫЙ ТРЕНИНГ В
ОБЛАСТИ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ,
АНАЛИТИЧЕСКОЙ
И ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ



ТЕХНОСФЕРА

интернет-магазин

OZON.RU



34737003

ISBN 978-5-94836-238-0



9 785948 362380