



# СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие редакторов перевода . . . . .	29
Предисловие . . . . .	30
Словарь символов и принятых сокращений . . . . .	33
<b>Глава 1. Введение . . . . .</b>	<b>41</b>
1.1. Предварительные сведения . . . . .	42
1.1.1. Что такое ВЭЖХ? . . . . .	42
1.1.2. Каковы возможности ВЭЖХ? . . . . .	45
1.2. Небольшой экскурс в историю ВЭЖХ . . . . .	47
1.3. Некоторые альтернативы ВЭЖХ . . . . .	50
1.3.1. Газовая хроматография (ГХ) . . . . .	50
1.3.2. Тонкослойная хроматография (ТСХ) . . . . .	50
1.3.3. Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) . . . . .	50
1.3.4. Капиллярный электрофорез (КЭ) . . . . .	51
1.3.5. Противоточная хроматография (ПТХ) . . . . .	51
1.3.6. Специальные виды ВЭЖХ . . . . .	52
1.4. Другие источники информации о ВЭЖХ . . . . .	52
1.4.1. Книги . . . . .	52
1.4.2. Журналы . . . . .	54
1.4.3. Обзоры . . . . .	54
1.4.4. Краткие курсы . . . . .	54
1.4.5. Интернет . . . . .	54
Литература . . . . .	54
<b>Глава 2. Основные принципы и управление разделением . . . . .</b>	<b>56</b>
2.1. Введение . . . . .	57
2.2. Хроматографический процесс . . . . .	57
2.3. Удерживание . . . . .	61
2.3.1. Фактор удерживания $k$ и мертвое время колонки $t_0$ . . . . .	61
2.3.2. Роль условий разделения и состава образца . . . . .	65
2.3.2.1. Межмолекулярные взаимодействия . . . . .	67
2.3.2.2. Температура . . . . .	71
2.4. Ширина пика и число теоретических тарелок колонки $N$ . . . . .	71
2.4.1. Зависимость $N$ от условий разделения . . . . .	73
2.4.1.1. Процессы размывания пика, определяющие значения $N$ . . . . .	76
2.4.1.2. Несколько рекомендаций по выбору колонки . . . . .	82
2.4.2. Форма пика . . . . .	86
2.5. Разрешение и разработка метода . . . . .	89
2.5.1. Оптимизация фактора удерживания $k$ (член $a$ в уравнении (2.24)) . . . . .	93
2.5.2. Оптимизация селективности $\alpha$ (член $b$ в уравнении (2.24)) . . . . .	95
2.5.2.1. «Правильные» и «неправильные» образцы . . . . .	96
2.5.3. Оптимизация числа теоретических тарелок $N$ (член $v$ в уравнении (2.24)) . . . . .	97
2.5.3.1. Зависимость результатов разделения от параметров колонки . . . . .	97
2.5.3.2. Скоростная ВЭЖХ . . . . .	99
2.5.4. Разработка метода . . . . .	101
2.5.4.1. Оценка состава образца и целей разделения . . . . .	101
2.5.4.2. Пробоподготовка . . . . .	102

2.5.4.3. Выбор вида хроматографии . . . . .	102
2.5.4.4. Выбор детектора . . . . .	102
2.5.4.5. Выбор хроматографических условий . . . . .	102
2.5.4.6. Спрогнозировать, определить и решить возможные проблемы. . . . .	103
2.5.4.7. Валидация метода и пригодность системы. . . . .	104
2.6. Влияние количества пробы . . . . .	105
2.6.1. Перегрузка по объему: влияние объема образца на разделение . . . . .	105
2.6.2. Перегрузка по массе: влияние массы образца на разделение. . . . .	107
2.6.3. Как избежать проблем, связанных со слишком большим количеством образца . . . . .	108
2.6.3.1. Если концентрация образца больше ожидаемой . . . . .	109
2.6.3.2. Анализ следовых количеств вещества . . . . .	109
2.7. Смежные темы . . . . .	110
2.7.1. Уравновешивание колонки. . . . .	110
2.7.2. Градиентное элюирование . . . . .	110
2.7.3. Пиковая емкость и двумерное разделение. . . . .	111
2.7.4. Отслеживание пика . . . . .	112
2.7.5. Вторичные равновесия . . . . .	114
2.7.6. Переключение колонок . . . . .	115
2.7.7. Предварительная оценка удерживания по структуре анализируемого вещества . . . . .	116
2.7.7.1. Модель сольватационных параметров . . . . .	118
Литература . . . . .	119
<b>Глава 3. Оборудование . . . . .</b>	<b>122</b>
3.1. Введение. . . . .	124
3.2. Резервуары и фильтрование элюентов . . . . .	125
3.2.1. Устройство резервуара и его использование . . . . .	126
3.2.2. Фильтрование подвижной фазы . . . . .	127
3.3. Дегазация подвижной фазы . . . . .	128
3.3.1. Требования к дегазации . . . . .	128
3.3.2. Дегазирование гелием . . . . .	130
3.3.3. Вакуумное дегазирование и онлайн-дегазирование . . . . .	131
3.4. Капилляры и соединения (фитинги) . . . . .	132
3.4.1. Капилляры. . . . .	132
3.4.1.1. Капилляры для низкого давления . . . . .	132
3.4.1.2. Капилляры для высокого давления . . . . .	133
3.4.2. Фитинги . . . . .	136
3.4.2.1. Фитинги для низкого давления . . . . .	136
3.4.2.2. Фитинги для высокого давления . . . . .	138
3.4.2.3. Специализированные фитинги . . . . .	139
3.5. Насосные системы . . . . .	141
3.5.1. Возратно-поступательные плунжерные насосы . . . . .	141
3.5.1.1. Двухплунжерные насосы . . . . .	145
3.5.1.2. Накопительные плунжерные насосы . . . . .	145
3.5.1.3. Активный клапан . . . . .	146
3.5.2. Смешивание в потоке . . . . .	146
3.5.2.1. Смешивание на стороне высокого давления . . . . .	147
3.5.2.2. Смешивание на стороне низкого давления . . . . .	148
3.5.2.3. Гибридные системы . . . . .	148
3.5.3. Градиентные системы. . . . .	149

3.5.4. Специальные методы . . . . .	150
3.5.4.1. Методы, использующие малые (микро- и нано-) скорости потока . . . . .	150
3.5.4.2. Методы, использующие высокие скорости потока (препаративные разделения) . . . . .	150
3.5.4.3. Методы, использующие высокое давление . . . . .	151
3.6. Автосамплеры . . . . .	151
3.6.1. Шестиходовой кран ввода образца . . . . .	151
3.6.1.1. Ввод из заполненной петли . . . . .	152
3.6.1.2. Ввод из частично заполненной петли . . . . .	152
3.6.2. Конструкция автосамплера . . . . .	154
3.6.2.1. Автосамплеры с заполнением петли засасыванием . . . . .	155
3.6.2.2. Автосамплеры с заполнением петли нагнетанием . . . . .	156
3.6.2.3. Автосамплер со встроенным петлевым дозатором . . . . .	156
3.6.3. Эффекты, связанные с количеством образца . . . . .	158
3.6.3.1. Вводимый объем . . . . .	158
3.6.3.2. Растворитель образца . . . . .	159
3.6.4. Другие области применения кранов . . . . .	160
3.6.4.1. Переключение колонок . . . . .	160
3.6.4.2. Коллекторы фракций . . . . .	162
3.6.4.3. Направление в слив . . . . .	162
3.7. Колоночные термостаты . . . . .	163
3.7.1. Требования к температурному контролю . . . . .	163
3.7.2. Устройство термостатов . . . . .	164
3.7.2.1. Нагревательные термостаты . . . . .	164
3.7.2.2. Воздушные термостаты . . . . .	164
3.7.2.3. Термостаты с элементами Пельтье . . . . .	164
3.8. Управляющие модули . . . . .	165
3.8.1. Сопровождение эксперимента . . . . .	166
3.8.2. Управление системой . . . . .	167
3.8.3. Сбор данных . . . . .	167
3.8.4. Обработка данных . . . . .	168
3.8.5. Создание отчета . . . . .	168
3.8.6. Регулирующие функции . . . . .	169
3.9. Влияние внеколоночных объемов . . . . .	169
3.10. Обслуживание . . . . .	170
3.10.1. Тест на работоспособность/пригодность системы . . . . .	170
3.10.1.1. Установочная, операционная и эксплуатационная квалификации . . . . .	170
3.10.1.2. Градиентное тестирование . . . . .	171
3.10.1.3. Дополнительная проверка системы . . . . .	174
3.10.2. Профилактика . . . . .	177
3.10.2.1. Периодическое обслуживание . . . . .	177
3.10.2.2. Рекомендации для рутинных методов . . . . .	180
3.10.3. Ремонтные работы . . . . .	182
3.10.3.1. Персонал . . . . .	182
3.10.3.2. Ведение учета . . . . .	182
3.10.3.3. Специальные рекомендации по ремонту . . . . .	183
Литература . . . . .	184

<b>Глава 4. Детектирование</b> . . . . .	185
4.1. Введение. . . . .	186
4.2. Характеристики детектора. . . . .	187
4.2.1. Общие положения . . . . .	187
4.2.2. Способы детектирования . . . . .	189
4.2.2.1. Детектирование, основанное на измерении общей характеристики вещества . . . . .	189
4.2.2.2. Детектирование, основанное на измерении специфических характеристик образца . . . . .	190
4.2.2.3. Детектирование с помощью модификации подвижной фазы . . . . .	190
4.2.2.4. Детектирование «независимыми» приборами. . . . .	190
4.2.3. Сигнал, шум, дрейф и точность измерений . . . . .	191
4.2.3.1. Шум и дрейф . . . . .	191
4.2.3.2. Отношение сигнал/шум (S/N). . . . .	194
4.2.4. Пределы обнаружения . . . . .	196
4.2.5. Линейность . . . . .	198
4.3. Общее предисловие к различным типам детекторов . . . . .	198
4.4. Детекторы, регистрирующие поглощение в УФ- и видимой областях спектра света . . . . .	198
4.4.1. Детекторы с фиксированной длиной волны . . . . .	201
4.4.2. Детекторы с переменной длиной волны . . . . .	202
4.4.3. Диодно-матричные детекторы . . . . .	203
4.4.4. Общие характеристики УФ-детекторов. . . . .	205
4.5. Флуоресцентные детекторы. . . . .	206
4.6. Электрохимические (амперометрические) детекторы . . . . .	209
4.7. Детекторы радиоактивности . . . . .	211
4.8. Кондуктометрические детекторы. . . . .	212
4.9. Хемилуминесцентный азотный детектор . . . . .	213
4.10. Хиральные детекторы . . . . .	215
4.11. Рефрактометрические детекторы . . . . .	216
4.12. Детекторы светорассеяния (ИДС) . . . . .	219
4.12.1. Испарительный детектор светорассеяния . . . . .	220
4.12.2. Детектор светорассеяния на центрах (ядрах) конденсации (ДСЦК) . . . . .	222
4.12.3. Лазерные детекторы светорассеяния (ЛДС). . . . .	222
4.13. Детектор заряженных аэрозолей . . . . .	223
4.14. Масс-спектрометрические детекторы (МС) . . . . .	224
4.14.1. Интерфейсы МС-детекторов (способы ионизации образца). . . . .	225
4.14.1.1. Ионизация электрораспылением (ИЭ) . . . . .	225
4.14.1.2. Химическая ионизация при атмосферном давлении (ХИАД) . . . . .	226
4.14.1.3. Другие модификации интерфейса МС-детекторов . . . . .	227
4.14.1.4. Соображения относительно скорости потока . . . . .	227
4.14.2. Квадруполи и ионные ловушки . . . . .	227
4.14.3. Другие виды МС-детекторов. . . . .	229
4.15. Другие «независимые» детекторы . . . . .	230
4.15.1. Инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием (ИКФП) . . . . .	230
4.15.2. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) . . . . .	231
4.16. Дериватизация образца и реакционные детекторы. . . . .	233
Литература . . . . .	235
<b>Глава 5. Колонки</b> . . . . .	237
5.1. Введение . . . . .	238
5.2. Носители . . . . .	238
5.2.1. Характеристики частиц . . . . .	239

5.2.1.1. Типы частиц . . . . .	239
5.2.1.2. Размер частиц и диаметр пор . . . . .	241
5.2.2. Носители на основе силикагеля . . . . .	242
5.2.2.1. Эффективность колонки . . . . .	244
5.2.2.2. Структура поверхности силикагеля . . . . .	246
5.2.2.3. Подготовка частиц . . . . .	248
5.2.3. Пористые полимеры. . . . .	249
5.2.4. Монолитные сорбенты. . . . .	250
5.2.4.1. Монолиты на основе силикагеля. . . . .	251
5.2.4.2. Монолиты на полимерной основе. . . . .	251
5.2.5. Другие неорганические частицы . . . . .	252
5.2.5.1. Оксид циркония . . . . .	253
5.2.5.2. Оксиды алюминия и титана . . . . .	254
5.2.5.3. Графитированный углерод . . . . .	254
5.3. Неподвижные фазы . . . . .	255
5.3.1. «Привитые» неподвижные фазы . . . . .	256
5.3.2. Другие органические неподвижные фазы . . . . .	260
5.3.2.1. Нанесенные полимеры . . . . .	260
5.3.2.2. Гибридные частицы . . . . .	260
5.3.2.3. Колонки для подвижных фаз с высоким содержанием воды . . . . .	261
5.3.3. Колонки с различными функциональными группами сорбента. . . . .	262
5.4. Селективность колонки . . . . .	263
5.4.1. Основы селективности обращенно-фазовой колонки . . . . .	264
5.4.1.1. Взаимодействия анализируемого вещества с сорбентом . . . . .	266
5.4.1.2. Селективность по форме молекулы . . . . .	269
5.4.2. Воспроизводимость характеристик колонки и «эквивалентные» колонки . . . . .	272
5.4.3. Ортогональное разделение . . . . .	273
5.4.4. В каких еще случаях нужно знать селективность колонки . . . . .	273
5.4.4.1. Размывание заднего фронта пика . . . . .	274
5.4.4.2. Несмачиваемость неподвижной фазы . . . . .	274
5.4.4.3. Снижение эффективности сорбента . . . . .	274
5.5. Типоразмеры колонок . . . . .	275
5.5.1. Фитинги . . . . .	275
5.5.2. Типоразмеры колонок . . . . .	276
5.6. Методы упаковки колонок . . . . .	277
5.6.1. Сухая упаковка . . . . .	277
5.6.2. Суспензионная упаковка жестких частиц . . . . .	277
5.6.2.1. Выбор растворителя для приготовления суспензии . . . . .	278
5.6.2.2. Жесткие полимерные частицы . . . . .	280
5.6.3. Упаковка мягких гелей. . . . .	281
5.7. Спецификации колонок . . . . .	281
5.7.1. Стандарты производителя . . . . .	281
5.7.2. Число теоретических тарелок колонки . . . . .	282
5.8. Обслуживание колонок . . . . .	283
Литература . . . . .	287
<b>Глава 6. Обращенно-фазовая хроматография нейтральных образцов . . . . .</b>	<b>289</b>
6.1. Введение . . . . .	290
6.1.1. Краткая история обращенно-фазовой хроматографии . . . . .	292

6.2. Удерживание	292
6.2.1. Сила растворителя	294
6.2.2. Механизм удерживания в ОФХ	296
6.3. Селективность	300
6.3.1. Зависимость селективности от силы растворителя	300
6.3.2. Зависимость селективности от типа растворителя	303
6.3.3. Зависимость селективности от температуры	306
6.3.3.1. Последующий анализ	309
6.3.4. Селективность колонки	310
6.3.5. Разделения изомеров	311
6.3.5.1. Повышенная селективность при разделении изомеров	312
6.3.5.2. Зависимость селективности от формы молекулы	313
6.3.6. Другие соображения, касающиеся селективности	314
6.3.6.1. Эквивалентное разделение	314
6.3.6.2. Ортогональное разделение	318
6.4. Разработка метода и стратегия оптимизации селективности	319
6.4.1. Оптимизация нескольких параметров	321
6.4.1.1. Смеси различных органических растворителей	322
6.4.1.2. Одновременное изменение элюирующей силы и типа растворителя	325
6.4.1.3. Одновременное изменение элюирующей силы и температуры растворителя	325
6.4.1.4. Замена колонки с одновременным изменением одного или более условий	328
6.4.2. Оптимизация условий изменением параметров колонки	329
6.5. Неводная обращенно-фазовая хроматография (НОФХ)	331
6.6. Специфические проблемы	331
6.6.1. Слабое удерживание образцов с высокой полярностью	332
6.6.2. Уширение заднего фронта пика	333
Литература	333
<b>Глава 7. Ионные образцы: обращенно-фазовая, ион-парная и ионообменная хроматография</b>	<b>336</b>
7.1. Введение	337
7.2. Кислотно-основные равновесия и удерживание в обращенно-фазовой хроматографии	337
7.2.1. Выбор буферов	344
7.2.1.1. $pK_a$ и емкость буфера	344
7.2.1.2. Другие свойства буфера	347
7.2.1.3. Какие буферы лучше использовать	349
7.2.2. Как $pK_a$ зависит от структуры соединения	349
7.2.3. Влияние органических растворителей и температуры на pH подвижной фазы и значения $pK_a$ образца	350
7.2.3.1. Влияние %В органического растворителя на эффективное значение $pK_a$ вещества	351
7.2.3.2. Влияние температуры на значения $pK_a$	352
7.3. Разделение ионных образцов методом обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ)	352
7.3.1. Как контролировать удерживание	352
7.3.2. Как контролировать селективность	353

7.3.2.1. рН подвижной фазы . . . . .	353
7.3.2.2. Сила растворителя (%В) и температура . . . . .	355
7.3.2.3. Тип растворителя . . . . .	356
7.3.2.4. Тип колонки . . . . .	356
7.3.2.5. Другие условия, которые могут влиять на селективность . . . . .	359
7.3.3. Разработка метода . . . . .	359
7.3.3.1. Начальные условия (этап 1) . . . . .	360
7.3.3.2. Оптимизация селективности (этап 3). . . . .	361
7.3.4. Нестандартные проблемы. . . . .	361
7.3.4.1. Чувствительность к рН . . . . .	361
7.3.4.2. Влияние силанольных групп . . . . .	362
7.3.4.3. Слабое удерживание образца. . . . .	364
7.3.4.4. Чувствительность к температуре . . . . .	364
7.4. Ион-парная хроматография (ИПХ) . . . . .	364
7.4.1. Основы удерживания . . . . .	366
7.4.1.1. рН и образование ионной пары . . . . .	367
7.4.1.2. Ион-парный реагент: тип и концентрация . . . . .	367
7.4.1.3. Одновременное изменение рН и концентрации ион-парного реагента (ИПР) . . . . .	370
7.4.2. Разработка метода . . . . .	371
7.4.2.1. Выбор начальных условий (этап 1) . . . . .	372
7.4.2.2. Управление селективностью (этап 3). . . . .	375
7.4.2.3. Выводы. . . . .	378
7.4.3. Нестандартные проблемы. . . . .	378
7.4.3.1. Ложные пики . . . . .	379
7.4.3.2. Медленное уравнивание колонки . . . . .	379
7.4.3.3. Искажение формы пиков . . . . .	380
7.5. Ионообменная хроматография (ИОХ) . . . . .	380
7.5.1. Основы удерживания . . . . .	382
7.5.2. Роль противоиона . . . . .	384
7.5.3. рН подвижной фазы. . . . .	385
7.5.4. Колонки для ИОХ . . . . .	385
7.5.5. Роль других условий. . . . .	386
7.5.6. Разработка метода . . . . .	386
7.5.7. Разделение углеводов . . . . .	387
7.5.8. Разделения в смешанном режиме . . . . .	387
Литература . . . . .	389
<b>Глава 8. Нормально-фазовая хроматография . . . . .</b>	<b>391</b>
8.1. Введение . . . . .	392
8.2. Удерживание . . . . .	393
8.2.1. Теория . . . . .	396
8.2.2. Зависимость силы растворителя от В-растворителя и от %В. . . . .	400
8.2.3. Использование данных ТСХ для предсказания удерживания в НФХ. . . . .	403
8.3. Селективность . . . . .	406
8.3.1. Зависимость селективности от элюирующей силы растворителя . . . . .	406
8.3.2. Зависимость селективности от типа растворителя. . . . .	406
8.3.3. Зависимость селективности от температуры . . . . .	406
8.3.4. Селективность колонки . . . . .	411

8.3.5. Разделения изомеров . . . . .	413
8.4. Рекомендации по разработке метода . . . . .	416
8.4.1. Начальные условия для разработки НФХ-метода: выбор элюирующей силы подвижной фазы и типа сорбента (шаги 1, 2; таблица 8.2) . . . . .	418
8.4.2. Стратегии оптимизации селективности (шаг 3; таблица 8.2) . . . . .	420
8.4.3. Пример разработки НФХ-метода . . . . .	420
8.5. Трудности, возникающие при использовании НФХ . . . . .	422
8.5.1. Плохая воспроизводимость разделения . . . . .	422
8.5.2. Обеднение элюента растворителем и медленное уравнивание колонок . . . . .	424
8.5.3. Уширение задних фронтов пиков . . . . .	424
8.6. Хроматография гидрофильных взаимодействий (ГИХ) . . . . .	425
8.6.1. Механизм удерживания . . . . .	426
8.6.2. Колонки . . . . .	427
8.6.3. Разработка метода ГИХ . . . . .	429
8.6.4. Трудности, связанные с ГИХ . . . . .	431
Литература . . . . .	431
<b>Глава 9. Градиентное элюирование . . . . .</b>	<b>433</b>
9.1. Введение . . . . .	434
9.1.1. Причины для использования градиентного элюирования . . . . .	435
9.1.2. Форма градиента . . . . .	437
9.1.3. Сходство изократического и градиентного элюирования . . . . .	438
9.1.3.1. Модель линейного изменения элюирующей силы растворителя (ЛИС) . . . . .	439
9.1.3.2. Перемещение зон при градиентном элюировании . . . . .	440
9.2. Экспериментальные условия и их влияние на разделение . . . . .	441
9.2.1. Влияние изменения параметров колонки . . . . .	444
9.2.2. Влияние изменения градиента . . . . .	447
9.2.2.1. Исходный %В . . . . .	447
9.2.2.2. Конечный %В . . . . .	449
9.2.2.3. Задержка градиента . . . . .	450
9.2.2.4. Приборный объем задержки . . . . .	452
9.2.2.5. Кусочно-линейные градиенты . . . . .	454
9.2.3. «Неправильные» образцы . . . . .	456
9.2.4. Количественные соотношения . . . . .	458
9.2.4.1. Время удерживания . . . . .	459
9.2.4.2. Измерение величин $S$ и $k_w$ . . . . .	460
9.2.4.3. Ширина пика . . . . .	461
9.2.4.4. Разрешение . . . . .	462
9.3. Разработка метода . . . . .	462
9.3.1. Первичное градиентное разделение . . . . .	463
9.3.1.1. Выбор между градиентным и изократическим элюированиями . . . . .	465
9.3.1.2. Возможные проблемы . . . . .	468
9.3.2. Оптимизация $k^*$ (этап 4 таблицы 9.2) . . . . .	469
9.3.3. Оптимизация селективности градиента $\alpha^*$ (этап 5 таблицы 9.2) . . . . .	470
9.3.4. Оптимизация диапазона градиента (этап 6 таблицы 9.2) . . . . .	470
9.3.5. Ступенчатые (нелинейные) градиенты (продолжение этапа 6 таблицы 9.2) . . . . .	472

9.3.6. Оптимизация числа теоретических тарелок $N^*$ (этап 7 таблицы 9.2) . . .	473
9.3.7. Определение необходимого времени уравнивания колонки (этап 8 таблицы 9.2) . . . . .	473
9.3.8. Воспроизводимость метода . . . . .	476
9.3.8.1. Разработка метода . . . . .	477
9.3.8.2. Рутинные анализы . . . . .	477
9.3.9. Пиковая емкость и экспресс-разделения . . . . .	478
9.3.9.1. Оптимизированная пиковая емкость . . . . .	480
9.3.9.2. Экспресс-разделения . . . . .	483
9.3.10. Комплексная двумерная ВЭЖХ (в соавторстве с Питером Шонмейкерсом) . . . . .	485
9.3.10.1. Концепция ЖХ/ЖХ . . . . .	485
9.3.10.2. Пиковая емкость . . . . .	488
9.3.10.3. Оборудование для ЖХ/ЖХ . . . . .	488
9.3.10.4. Разработка метода для ЖХ/ЖХ . . . . .	489
9.4. Разделение крупных молекул . . . . .	491
9.5. Другие виды разделения . . . . .	492
9.5.1. Теория . . . . .	492
9.5.2. Нормально-фазовая хроматография . . . . .	493
9.5.3. Гидрофильная хроматография (ГИХ) . . . . .	493
9.5.3.1. Прикладные задачи . . . . .	494
9.5.3.2. Условия разделения . . . . .	496
9.5.4. Ионообменная хроматография (ИОХ) . . . . .	496
9.6. Проблемы . . . . .	496
9.6.1. Обеднение растворителем . . . . .	496
9.6.2. Системные пики . . . . .	497
9.6.3. Дрейф базовой линии . . . . .	497
Литература . . . . .	497
<b>Глава 10. Разработка метода с помощью программного обеспечения . . . . .</b>	<b>500</b>
10.1. Введение . . . . .	501
10.1.1. Основы и история компьютерного моделирования . . . . .	503
10.1.2. Когда использовать компьютерное моделирование . . . . .	504
10.1.2.1. Преимущества . . . . .	505
10.1.2.2. Недостатки . . . . .	505
10.2. Программное обеспечение компьютерного моделирования . . . . .	506
10.2.1. Работа с программой DryLab . . . . .	507
10.2.2. Оптимизация градиента . . . . .	509
10.2.3. Другие возможности . . . . .	511
10.2.3.1. Прогнозирование изократического элюирования на основе данных градиентного элюирования . . . . .	511
10.2.3.2. Выбор определенного пика . . . . .	512
10.2.3.3. Изменение других условий . . . . .	512
10.2.3.4. Компьютерный подбор наилучшего кусочно-линейного градиента . . . . .	512
10.2.3.5. Уширение заднего фронта пика . . . . .	514
10.2.3.6. Метод двух разделений для улучшения разрешения образца .	514
10.2.3.7. Примеры использования компьютерного моделирования при разработке метода . . . . .	514
10.2.4. Отслеживание пиков . . . . .	515

10.2.5. Источники коммерчески доступного программного обеспечения для компьютерного моделирования хроматографических разделений . . . . .	516
10.3. Другое программное обеспечение для разработки метода . . . . .	516
10.3.1. Удерживание анализируемого вещества и его молекулярная структура . . . . .	517
10.3.2. Величины $r_{K_a}$ анализируемого вещества и его молекулярная структура . . . . .	517
10.3.3. Селективность ОФХ-колонки . . . . .	517
10.3.4. Экспертные системы для разработки метода . . . . .	518
10.4. Компьютерное моделирование и разработка метода . . . . .	518
10.4.1. Пример 1: разделение смеси производных лизергиновой кислоты . . . . .	518
10.4.2. Пример 2: альтернативная стратегия разработки метода . . . . .	520
10.4.3. Проверка устойчивости метода . . . . .	522
10.4.4. Заключение . . . . .	523
Литература . . . . .	523
<b>Глава 11. Качественный и количественный анализ . . . . .</b>	<b>525</b>
11.1. Введение . . . . .	526
11.2. Измерение сигнала . . . . .	526
11.2.1. Принцип работы интегратора . . . . .	527
11.2.1.1. Сбор данных . . . . .	527
11.2.1.2. Распознавание пика . . . . .	530
11.2.1.3. Интегрирование неидеальных хроматограмм . . . . .	530
11.2.1.4. Обычные ошибки интегрирования . . . . .	532
11.2.1.5. Дополнительные советы . . . . .	533
11.2.2. Удерживание . . . . .	534
11.2.3. Размер пика . . . . .	535
11.2.4. Источники ошибок . . . . .	535
11.2.4.1. Отбор проб и пробоподготовка . . . . .	536
11.2.4.2. Хроматографическое разделение . . . . .	536
11.2.4.3. Детектирование . . . . .	536
11.2.4.4. Измерение пика . . . . .	537
11.2.4.5. Калибровка . . . . .	537
11.2.5. Пределы обнаружения и определения . . . . .	539
11.2.5.1. Предел обнаружения (ПО) . . . . .	540
11.2.5.2. Нижний предел количественного определения (НПКО или ПКО) . . . . .	542
11.2.5.3. Верхний предел . . . . .	542
11.2.5.4. Образцы с концентрациями, лежащими вне пределов метода . . . . .	543
11.3. Качественный анализ . . . . .	544
11.3.1. Время удерживания . . . . .	544
11.3.2. Качественный анализ в реальном времени . . . . .	545
11.3.2.1. УФ-детекторы . . . . .	546
11.3.2.2. Жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) . . . . .	546
11.3.2.3. ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием (ИКФП) . . . . .	547
11.3.2.4. Жидкостная хроматография с детектором ядерного магнитного резонанса (ЖХ-ЯМР) . . . . .	547
11.3.2.5. Хемилюминесцентный азотный детектор (ХЛАД) . . . . .	547
11.3.2.6. Лазерный детектор светорассеяния (ЛДС) . . . . .	547

11.3.2.7. Хиральные детекторы . . . . .	547
11.3.2.8. Качественный анализ в автономном режиме (офлайн анализ) . . . . .	548
11.4. Количественный анализ . . . . .	548
11.4.1. Калибровка . . . . .	548
11.4.1.1. Калибровка внешним стандартом . . . . .	549
11.4.1.2. Калибровка внутренним стандартом . . . . .	552
11.4.1.3. Нормирование площадей пиков . . . . .	554
11.4.1.4. Метод стандартных добавок . . . . .	555
11.4.1.5. Оценка калибровочных кривых . . . . .	556
11.4.2. Анализ следовых количеств . . . . .	558
11.5. Выводы . . . . .	558
Литература . . . . .	559
<b>Глава 12. Валидация метода (совместно с Майклом Шварцем) . . . . .</b>	<b>560</b>
12.1. Введение . . . . .	562
12.2. Термины и определения . . . . .	565
12.2.1. Правильность . . . . .	566
12.2.2. Прецизионность . . . . .	568
12.2.2.1. Повторяемость . . . . .	568
12.2.2.2. Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность . . . . .	568
12.2.2.3. Воспроизводимость . . . . .	569
12.2.2.4. Надежность . . . . .	569
12.2.3. Специфичность . . . . .	569
12.2.4. Предел обнаружения и предел количественного определения . . . . .	569
12.2.5. Линейность и аналитическая область . . . . .	571
12.2.6. Устойчивость . . . . .	572
12.3. Пригодность системы . . . . .	573
12.4. Документация . . . . .	575
12.4.1. Валидационный протокол . . . . .	575
12.4.2. Метод испытания . . . . .	576
12.4.3. Валидационный отчет . . . . .	577
12.5. Валидация для различных типов фармацевтических методов . . . . .	578
12.5.1. Методы категории 1 . . . . .	578
12.5.2. Методы категории 2 . . . . .	578
12.5.3. Методы категории 3 . . . . .	579
12.5.4. Методы категории 4 . . . . .	580
12.6. Биоаналитические методы . . . . .	580
12.6.1. Подготовка стандартного образца . . . . .	581
12.6.2. Разработка и валидация биоаналитического метода . . . . .	581
12.6.2.1. Избирательность . . . . .	582
12.6.2.2. Правильность, прецизионность и степень извлечения . . . . .	582
12.6.2.3. Калибровочные/стандартные кривые . . . . .	583
12.6.2.4. Стабильность биоаналитического образца . . . . .	584
12.6.3. Рутинное применение биоаналитического метода . . . . .	585
12.6.4. Документирование биоаналитического метода . . . . .	586
12.7. Передача (трансфер) методики анализа в принимающую лабораторию (ТМА) . . . . .	587
12.7.1. Опции передачи (трансфера) методики анализа . . . . .	588
12.7.1.1. Сравнительное тестирование . . . . .	588
12.7.1.2. Совместная валидация . . . . .	589

12.7.1.3. Валидация и/или повторная валидация метода . . . . .	589
12.7.1.4. Отказ от оформления передачи метода испытания . . . . .	589
12.7.2. Основы ТМА . . . . .	590
12.7.2.1. Предварительно утвержденный протокол плана тестирования . . . . .	590
12.7.2.2. Описание метода / процедуры испытаний . . . . .	590
12.7.2.3. Описание и обоснование требований к тестам . . . . .	592
12.7.2.4. Критерии приемлемости . . . . .	592
12.7.2.5. Документирование результатов . . . . .	593
12.7.3. Потенциальные ошибки при ТМА . . . . .	593
12.7.3.1. Оценка оборудования . . . . .	594
12.7.3.2. Колонки ВЭЖХ . . . . .	594
12.7.3.3. Обучение оператора . . . . .	594
12.8. Корректировка методики или модификация методики . . . . .	595
12.8.1. Корректировка рН . . . . .	597
12.8.2. Концентрация соли в буфере . . . . .	597
12.8.3. Соотношение компонентов в подвижной фазе . . . . .	597
12.8.4. Длина волны УФ/ВИД фотометрического детектора . . . . .	598
12.8.5. Корректировка температуры . . . . .	598
12.8.6. Изменение длины и диаметра колонки, размера частиц сорбента . . . . .	598
12.9. Контроль качества и обеспечение качества . . . . .	599
12.9.1. Контроль качества . . . . .	599
12.9.2. Обеспечение качества . . . . .	599
12.10. Выводы . . . . .	600
Литература . . . . .	601
<b>Глава 13. Разделение биополимеров и синтетических полимеров</b> <i>(совместно с Тимоти Вером, Карлом Сканделлой и Петером Шонмейкерсом)</i> . . . . .	602
13.1. Биомакромолекулы . . . . .	605
13.2. Молекулярная структура и конформация . . . . .	605
13.2.1. Пептиды и белки (полипептиды) . . . . .	606
13.2.1.1. Первичная структура . . . . .	606
13.2.1.2. Вторичная структура . . . . .	606
13.2.1.3. Третичная и четвертичная структуры . . . . .	606
13.2.1.4. Посттрансляционные модификации . . . . .	609
13.2.2. Нуклеиновые кислоты . . . . .	609
13.2.2.1. Одноцепочечные нуклеиновые кислоты . . . . .	609
13.2.2.2. Двухцепочечные нуклеиновые кислоты . . . . .	609
13.2.3. Углеводы . . . . .	610
13.2.4. Вирусы . . . . .	612
13.3. Особенности ВЭЖХ биомолекул . . . . .	614
13.3.1. Характеристики колонок . . . . .	614
13.3.1.1. Размер пор . . . . .	614
13.3.1.2. Размер частиц . . . . .	615
13.3.1.3. Характеристики и стабильность носителя . . . . .	617
13.3.1.4. Выход и биологическая активность . . . . .	618
13.3.2. Влияние структуры белка на его поведение при хроматографическом разделении . . . . .	618
13.4. Разделение пептидов и белков . . . . .	619
13.4.1. Обращенно-фазовая хроматография (ОФХ) . . . . .	619

13.4.1.1. Выбор колонки . . . . .	620
13.4.1.2. Выбор подвижной фазы . . . . .	621
13.4.1.3. Температура . . . . .	624
13.4.1.4. Градиентное элюирование . . . . .	625
13.4.1.5. Влияние конформации полипептида . . . . .	628
13.4.1.6. Капиллярные колонки и наноисточники ионизации . . . . .	630
13.4.1.7. Разработка метода ОФХ . . . . .	631
13.4.2. Ионообменная хроматография (ИОХ) и смежные методы . . . . .	633
13.4.2.1. Выбор колонки . . . . .	636
13.4.2.2. Выбор подвижной фазы . . . . .	638
13.4.2.3. Хроматофокусирование . . . . .	639
13.4.2.4. Хроматография на гидроксипатите . . . . .	640
13.4.2.5. Аффинная хроматография на сорбентах с иммобилизованными металлами (АХИМ) . . . . .	641
13.4.3. Хроматография гидрофобных взаимодействий (ХГВ) . . . . .	645
13.4.3.1. Сорбенты и лиганды для ХГВ . . . . .	646
13.4.3.2. Другие условия . . . . .	647
13.4.4. Хроматография гидрофильных взаимодействий (ГИХ) . . . . .	648
13.4.4.1. Неподвижные фазы, используемые в ГИХ . . . . .	650
13.4.4.2. Подвижные фазы для ГИХ . . . . .	650
13.4.4.3. Применение ГИХ в разделении пептидов и белков . . . . .	650
13.4.4.4. Хроматография гидрофильных взаимодействий с электростатическим отталкиванием (ГИХЭО) . . . . .	651
13.4.5. Многомерная жидкостная хроматография (МЖХ) в протеомике . . . . .	652
13.4.5.1. Использование коллектора фракций . . . . .	653
13.4.5.2. Непосредственно соединенные колонки для МЖХ . . . . .	654
13.4.5.3. МЖХ с переключением колонок . . . . .	654
13.5. Разделение нуклеиновых кислот . . . . .	655
13.5.1. Анионообменная хроматография . . . . .	655
13.5.2. Обращенно-фазовая хроматография . . . . .	657
13.5.2.1. Олигонуклеотиды . . . . .	657
13.5.2.2. Фрагменты, полученные рестрикцией, и продукты ПЦР . . . . .	658
13.5.2.3. Денатурирующая ВЭЖХ . . . . .	658
13.5.2.4. ОФХ-5 хроматография . . . . .	660
13.5.3. Хроматография гидрофобных взаимодействий . . . . .	661
13.6. Разделение углеводов . . . . .	662
13.6.1. Хроматография гидрофильных взаимодействий . . . . .	662
13.6.2. Распределительная хроматография с управляемой ионами селективностью . . . . .	663
13.6.3. Высокоэффективная анионообменная хроматография . . . . .	665
13.7. Разделение вирусов . . . . .	667
13.8. Эксклюзионная хроматография (ЭХ) . . . . .	668
13.8.1. Процесс разделения в ЭХ . . . . .	669
13.8.2. Колонки для ЭХ . . . . .	671
13.8.2.1. Сорбенты . . . . .	672
13.8.2.2. Размер пор и пористость . . . . .	673
13.8.2.3. Диаметр частиц . . . . .	673
13.8.2.4. Увеличение разрешения в ЭХ . . . . .	674
13.8.3. Подвижные фазы для ЭХ . . . . .	674
13.8.4. Соображения по эксплуатации . . . . .	675

13.8.4.1. Емкость колонки . . . . .	675
13.8.4.2. Использование денатурирующих условий . . . . .	675
13.8.4.3. Калибровка колонки . . . . .	676
13.8.4.4. Использование неидеальных условий разделения . . . . .	676
13.8.5. Преимущества и недостатки ЭХ . . . . .	676
13.8.6. Применение ЭХ . . . . .	677
13.8.6.1. Аналитические приложения . . . . .	678
13.8.6.2. Препаративные приложения . . . . .	679
13.9. Крупномасштабная очистка биомакромолекул . . . . .	680
13.9.1. История вопроса . . . . .	680
13.9.2. Очистка рекомбинантного инсулина человека в промышленном масштабе . . . . .	681
13.9.2.1. Цели очистки . . . . .	681
13.9.2.2. Неподвижные фазы . . . . .	682
13.9.2.3. Упаковка колонки . . . . .	682
13.9.2.4. Стабильность продукта и колонки . . . . .	682
13.9.2.5. Состав подвижной фазы . . . . .	682
13.9.2.6. Разделение . . . . .	682
13.9.2.7. Регенерация колонки . . . . .	684
13.9.2.8. Очистка в лабораторном масштабе . . . . .	685
13.9.2.9. Масштабирование . . . . .	685
13.9.2.10. Очистка в промышленных масштабах . . . . .	686
13.9.3. Общие требования к препаративной очистке с использованием ЖХ . . . . .	687
13.10. Синтетические полимеры . . . . .	688
13.10.1. Базовые понятия и принципы . . . . .	688
13.10.2. Приемы анализа полимеров . . . . .	691
13.10.3. Методы жидкостной хроматографии для анализа полимеров . . . . .	692
13.10.3.1. Гель-проникающая хроматография (ГПХ) . . . . .	692
13.10.3.2. Интерактивная жидкостная хроматография . . . . .	692
13.10.3.3. Жидкостная хроматография в критических условиях . . . . .	695
13.10.3.4. Другие методы . . . . .	695
13.10.3.5. Химический состав как функция размера молекулы . . . . .	696
13.10.4. Разделение полимеров с помощью двумерной хроматографии . . . . .	697
Литература . . . . .	698

#### **Глава 14. Разделение энантиомеров**

<i>(Михаэль Лэммерхофер, Норберт М. Майер, Вольфганг Линднер)</i> . . . . .	703
14.1. Введение . . . . .	704
14.2. Основы и определения . . . . .	704
14.2.1. Изомерия и хиральность . . . . .	705
14.2.2. Хиральное распознавание и разделение энантиомеров . . . . .	707
14.3. Косвенный метод . . . . .	708
14.4. Прямой метод . . . . .	712
14.4.1. Метод хиральных добавок к подвижной фазе (ХДПФ) или аддитивный метод . . . . .	712
14.4.2. Использование хиральной неподвижной фазы (ХНФ) . . . . .	715
14.4.3. Принципы хирального распознавания . . . . .	716
14.4.3.1. «Модель трехточечного присоединения» . . . . .	716
14.4.3.2. Влияние подвижной фазы . . . . .	718
14.5. Дисперсия и уширение задних фронтов пиков . . . . .	719

14.6. Хиральные неподвижные фазы и их характеристики . . . . .	719
14.6.1. ХНФ на основе полисахаридов . . . . .	720
14.6.2. Синтетические полимерные ХНФ . . . . .	727
14.6.3. ХНФ на основе белков . . . . .	731
14.6.4. ХНФ на основе циклодекстрина . . . . .	735
14.6.5. ХНФ на основе макроциклических антибиотиков . . . . .	738
14.6.6. ХНФ на основе хиральных краун-эфиров . . . . .	744
14.6.7. Донорно-акцепторные ХНФ . . . . .	746
14.6.8. Хиральные ионообменники . . . . .	749
14.6.9. Лигандообменные ХНФ. Хиральная лигандообменная хроматография (ХЛОХ) . . . . .	752
14.7. Термодинамические аспекты . . . . .	754
14.7.1. Термодинамика ассоциации анализируемого вещества с селектором .	754
14.7.2. Термодинамика прямого хроматографического разделения энантиомеров . . . . .	755
14.7.3. Термодинамика гетерогенной хиральной поверхности . . . . .	755
Литература . . . . .	757
<b>Глава 15. Препаративные разделения (совместно с Джеффом Коксом) . . . . .</b>	<b>762</b>
15.1. Введение . . . . .	763
15.1.1. Перегрузка колонки и последствия этого . . . . .	763
15.1.2. Масштаб разделения . . . . .	764
15.1.2.1. Колонки большего диаметра . . . . .	765
15.1.2.2. Оптимизированные условия для преп-ЖХ . . . . .	765
15.1.2.3. Другие соображения . . . . .	767
15.2. Оборудование для преп-ЖХ-разделения . . . . .	767
15.2.1. Колонки . . . . .	768
15.2.2. Введение образца . . . . .	769
15.2.2.1. Инжекторы с петлей ввода . . . . .	769
15.2.2.2. Насосный ввод . . . . .	770
15.2.3. Детекторы . . . . .	771
15.2.3.1. УФ-детекторы . . . . .	771
15.2.3.2. Другие детекторы . . . . .	771
15.2.4. Сбор фракций . . . . .	772
15.2.5. Выделение продукта (удаление подвижной фазы) . . . . .	773
15.3. Изократическое элюирование . . . . .	775
15.3.1. Количество образца и разделение . . . . .	775
15.3.1.1. Изотермы сорбции . . . . .	775
15.3.1.2. Ширина пика при разделениях малых количеств образцов в сравнении с шириной пика при разделениях больших количеств образцов . . . . .	777
15.3.2. Разделение по методу соприкасающихся пиков . . . . .	777
15.3.2.1. Емкость насыщения колонки . . . . .	779
15.3.2.2. Перегрузка по объему образца . . . . .	780
15.3.2.3. Растворимость образца . . . . .	781
15.3.2.4. Разработка метода . . . . .	783
15.3.2.5. Сбор фракций . . . . .	785
15.4. Значительно перегруженное разделение . . . . .	786
15.4.1. Полнота извлечения или чистота . . . . .	786
15.4.2. Разработка метода . . . . .	786

15.4.2.1. Эффективность колонки . . . . .	788
15.4.2.2. «Пересечение изотерм» . . . . .	788
15.5. Градиентное элюирование . . . . .	790
15.5.1. Сравнение изократической и градиентной преп-ЖХ . . . . .	791
15.5.2. Разработка метода для градиентной преп-ЖХ . . . . .	792
15.6. Промышленное разделение . . . . .	795
Литература . . . . .	796
<b>Глава 16. Пробоподготовка (в соавторстве с Рональдом Мэджерсом)</b> . . . . .	<b>797</b>
16.1. Введение . . . . .	799
16.2. Виды образцов . . . . .	800
16.3. Предварительная обработка твердых и полутвердых образцов . . . . .	803
16.3.1. Измельчение образцов . . . . .	803
16.3.2. Высушивание образцов . . . . .	804
16.3.3. Фильтрование . . . . .	804
16.4. Подготовка жидких образцов . . . . .	805
16.5. Экстракция в системе жидкость — жидкость . . . . .	806
16.5.1. Теория . . . . .	806
16.5.2. Практика . . . . .	808
16.5.3. Трудности . . . . .	810
16.5.3.1. Образование эмульсии . . . . .	810
16.5.3.2. Адсорбция растворенного вещества . . . . .	810
16.5.3.3. Связывание растворенного вещества . . . . .	811
16.5.3.4. Взаимная растворимость фаз . . . . .	811
16.5.4. Специальные подходы к ЖЖЭ . . . . .	811
16.5.4.1. Микроэкстракция . . . . .	811
16.5.4.2. Микроэкстракция методом одной капли (МОК) . . . . .	811
16.5.4.3. ЖЖЭ на твердой фазе (ТФЖЖЭ) . . . . .	812
16.5.4.4. Жидкостная экстракция на иммобилизованном носителе (ИЖЭ) . . . . .	812
16.6. Твердофазная экстракция (ТФЭ) . . . . .	812
16.6.1. Сравнение ТФЭ и ВЭЖХ . . . . .	813
16.6.2. Применение ТФЭ . . . . .	814
16.6.2.1. Удаление примесей . . . . .	815
16.6.2.2. Обогащение образца . . . . .	815
16.6.2.3. Обессоливание . . . . .	815
16.6.2.4. Другие применения . . . . .	815
16.6.3. Приспособления для проведения ТФЭ . . . . .	816
16.6.3.1. Картриджи . . . . .	816
16.6.3.2. Диски . . . . .	816
16.6.3.3. Другие приспособления для ТФЭ . . . . .	817
16.6.4. Устройство для ТФЭ . . . . .	819
16.6.5. Разработка метода для ТФЭ . . . . .	820
16.6.5.1. Этапы ТФЭ . . . . .	821
16.6.5.2. Сорбенты для ТФЭ . . . . .	823
16.6.6. Пример разработки ТФЭ-метода: выделение альбутерола из плазмы крови человека . . . . .	826
16.6.7. Специальные виды ТФЭ . . . . .	827
16.6.7.1. Мультимодалая ТФЭ и ТФЭ со смешанными фазами . . . . .	827
16.6.7.2. Адсорбенты с ограниченно доступной поверхностью (ОДП) . . . . .	828

16.6.7.3. Молекулярно-импринтированные полимеры (МИП) . . . . .	829
16.6.7.4. Иммуноаффинная экстракция малых молекул . . . . .	830
16.6.7.5. QuEChERS и дисперсионная ТФЭ . . . . .	831
16.6.7.6. Специализированные ТФЭ-картриджи для различных классов соединений . . . . .	832
16.7. Мембранные технологии в пробоподготовке . . . . .	832
16.8. Методы пробоподготовки твердых образцов . . . . .	833
16.8.1. Традиционные методы экстракции . . . . .	834
16.8.2. Современные методы экстракции из твердых веществ . . . . .	836
16.8.2.1. Экстракция в современном аппарате Сокслета . . . . .	836
16.8.2.2. Сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ) . . . . .	836
16.8.2.3. Жидкостная экстракция под давлением (ЖЭД) / ускоренная экстракция растворителем (УСЭР) . . . . .	837
16.8.2.4. Экстракция с микроволновым нагреванием (МЭ) . . . . .	838
16.9. Переключение колонок . . . . .	838
16.10. Пробоподготовка в биохроматографии . . . . .	839
16.11. Пробоподготовка в ЖХ-МС . . . . .	842
16.12. Дериватизация в ВЭЖХ . . . . .	844
Литература . . . . .	846
<b>Глава 17. Неисправности и способы их устранения . . . . .</b>	<b>850</b>
17.1. Введение . . . . .	852
17.2. Профилактика проблем . . . . .	853
17.2.1. Тесты на пригодность (работоспособность) системы . . . . .	853
17.2.1.1. Установочная квалификация (УК), операционная квалификация (ОК) и эксплуатационная квалификация (ЭК) . . . . .	854
17.2.1.2. Тест на эффективность (рабочие характеристики) градиента . . . . .	854
17.2.1.3. Дополнительное тестирование системы . . . . .	854
17.2.2. Профилактическое обслуживание . . . . .	854
17.2.3. Тестирование пригодности системы . . . . .	855
17.2.4. Хронологические записи . . . . .	855
17.2.5. Полезные советы и методы . . . . .	856
17.2.5.1. Удаление воздуха из насоса . . . . .	856
17.2.5.2. Проверка гидравлического затвора растворителей . . . . .	857
17.2.5.3. Предварительное смешивание для повышения воспроизводимости удерживания в плавных градиентах . . . . .	857
17.2.5.4. Очистка и обслуживание обратных клапанов . . . . .	858
17.2.5.5. Обнаружение утечек . . . . .	858
17.2.5.6. Устранение негерметичности соединений . . . . .	859
17.2.5.7. Мытье химической посуды . . . . .	859
17.2.5.8. Улучшение разделения с помощью трифторуксусной кислоты . . . . .	859
17.2.5.9. Получение высокоочищенной воды . . . . .	860
17.2.5.10. Устранение остаточных примесей . . . . .	860
17.3. Стратегии выявления проблем . . . . .	862
17.3.1. Найти и исправить . . . . .	862
17.3.2. Упрощать вместо усложнения . . . . .	863
17.3.3. Менять за один раз один параметр . . . . .	863
17.3.4. Устранение воспроизводимых сложностей . . . . .	863

17.3.5. Замена частей . . . . .	863
17.3.6. Вернуть на место . . . . .	864
17.4. Общие симптомы ВЭЖХ-проблем . . . . .	864
17.4.1. Утечки . . . . .	865
17.4.1.1. Утечки на линии до насоса . . . . .	865
17.4.1.2. Утечки в насосе . . . . .	866
17.4.1.3. Утечки на стороне высокого давления . . . . .	868
17.4.1.4. Утечки в автосамплере . . . . .	868
17.4.1.5. Утечки в колонке . . . . .	871
17.4.1.6. Утечки в детекторе . . . . .	872
17.4.2. Аномальное давление . . . . .	873
17.4.2.1. Слишком высокое давление . . . . .	874
17.4.2.2. Слишком низкое давление . . . . .	875
17.4.2.3. Нестабильность давления . . . . .	877
17.4.3. Нестабильность времени удерживания . . . . .	877
17.4.3.1. Проблемы, связанные со скоростью потока . . . . .	878
17.4.3.2. Проблемы, связанные с размером колонки . . . . .	878
17.4.3.3. Проблемы, связанные с подвижной фазой . . . . .	878
17.4.3.4. Проблемы, связанные с неподвижной фазой . . . . .	879
17.4.3.5. Проблемы, связанные с изменениями температуры . . . . .	879
17.4.3.6. Симптомы проблем, связанных с удерживанием . . . . .	880
17.4.4. Площадь пика . . . . .	882
17.4.4.1. Слишком большая площадь пика . . . . .	882
17.4.4.2. Слишком маленькая площадь пика . . . . .	884
17.4.4.3. Изменяющаяся величина площади пика . . . . .	884
17.4.5. Другие проблемы, связанные с хроматограммой . . . . .	885
17.4.5.1. Проблемы, вызывающие дрейф базовой линии . . . . .	885
17.4.5.2. Проблемы шумов базовой линии . . . . .	888
17.4.5.3. Проблемы, связанные с формой пика . . . . .	891
17.4.6. Интерпретация тестов на пригодность (работоспособность) системы . . . . .	901
17.4.6.1. Интерпретация градиентного тестирования . . . . .	901
17.4.6.2. Интерпретация дополнительных тестов системы . . . . .	908
17.5. Таблицы по устранению неисправностей . . . . .	909
Литература . . . . .	920
<b>Приложение I. Свойства растворителей, используемых в ВЭЖХ . . . . .</b>	<b>922</b>
I.1. Совместимость растворителя с детектором . . . . .	922
I.1.1. Детектирование по поглощению в ультрафиолете . . . . .	922
I.1.2. Детектирование по показателю преломления . . . . .	925
I.1.3. Детектирование масс-спектрометром . . . . .	925
I.2. Полярность и селективность растворителей . . . . .	925
I.3. Безопасность при работе с растворителями . . . . .	928
Литература . . . . .	929
<b>Приложение II. Приготовление буферных подвижных фаз . . . . .</b>	<b>930</b>
II.1. Последовательность операций . . . . .	930
II.2. Методики приготовления некоторых широко используемых буферов . . . . .	931
Литература . . . . .	932
Предметный указатель . . . . .	932

## ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРОВ ПЕРЕВОДА

Перед вами не просто книга, а титанический труд Ллойда Снайдера, Джека Киркленда и Джона Долана, посвященный ВЭЖХ. Это и учебник, и справочник, и даже энциклопедия по всем (или почти по всем) вопросам, связанным с ВЭЖХ. На сегодняшний день третье издание «Введения в современную жидкостную хроматографию» — одно из самых популярных в мире справочных руководств на эту тему. Что и говорить, перевод этой книги на русский язык задержался, но лучше поздно, чем еще позднее.

В книге освещено огромное количество вопросов, связанных с теорией хроматографии, современным оборудованием ВЭЖХ, методами детектирования и устройством детекторов, подробно рассмотрены теоретические и практические аспекты выбора неподвижных и подвижных фаз. Особое внимание уделено обращенно-фазовой, нормально-фазовой, гель-проникающей, гидрофобной, гидрофильной и другим видам хроматографии. Отдельные главы посвящены разделению синтетических и природных полимеров, препаративной хроматографии, разделению энантиомеров, пробоподготовке, типовым проблемам при работе с хроматографическим оборудованием и, что особенно важно в современных условиях, валидации аналитических методов.

В.А. Жуковский говорил, что «переводчик в прозе — раб, а переводчик в стихах — соперник». Коллектив переводчиков этой книги решил быть соперниками. В тех случаях, когда оригинальный текст устарел, или необходимо было дать дополнительные разъяснения, или у переводчиков имелось на этот счет другое мнение, они писали примечания к переводу.

Перевод главы 13 сделан к.х.н. С.В. Шульгой-Морским, а главы 14 — к.х.н. А.А. Новоженец. Коллектив переводчиков хотел бы поблагодарить к.х.н. А.А. Колотвина за участие в редактировании главы 12, к.х.н. Л.Д. Аснина за участие в редактировании главы 14 и К.Е. Маркачеву за помощь при оформлении многочисленных рисунков и графиков.

к.т.н. М.Б. Бару  
И.В. Важенина  
д.х.н. С.М. Староверов

# ПРЕДИСЛОВИЕ

В настоящее время высокоэффективная хроматография (ВЭЖХ) является основной технологией химического анализа и его приложений. С ее помощью возможно разделить, проанализировать и очистить практически любой образец. Второе издание этой книги появилось в 1979 году и стало для десятков тысяч читателей справочником по ВЭЖХ. Заметный успех второго издания (вкуче со значительными продажами в первом десятилетии нынешнего века) может быть отнесен к ряду достоинств, которые перешли и в эту книгу. Во-первых, все три издания выросли из кратких курсов, прочитанных за последние сорок лет тремя авторами перед аудиторией, состоящей из более чем десяти тысяч хроматографистов, работающих в промышленности, исследовательских институтах и правительственных учреждениях. Преподавание позволяет опробовать и оценить различные подходы к предмету изложения. Когда студенты являются практикующими хроматографистами, особенно важен практический подход. Во-вторых, во всех трех изданиях мы попытались объединить практические советы (как?) с теоретической основой (почему?). И теория, и практика даны так, чтобы читатель мог лучше понять и оценить данные в книге рекомендации. И, наконец, каждый из трех авторов на протяжении большей части своей карьеры был активным участником исследований в области ВЭЖХ и/или ее практического применения.

С момента подготовки второго издания в 1979 году существенно улучшились колонки и хроматографическое оборудование. Кроме того, мы существенно продвинулись в направлении (1) понимания ВЭЖХ-разделения, (2) нашей способности решать проблемы, которые раньше было сложно решить, и (3) применения ВЭЖХ для разделения новых типов образцов. В то время как во втором издании было уделено равное внимание шести различным ВЭЖХ-методам, в третьем основное (но не исключительное) внимание направлено на обращенно-фазовую хроматографию, которая в настоящее время составляет около 80% всех ВЭЖХ-приложений. За последние три десятилетия использование ВЭЖХ для работы с биологическими образцами, для разделения энантиомеров и для очистки веществ возросло чрезвычайно и сопровождалось более глубоким пониманием сути этих и других областей ее применения.

Продолжается совершенствование коммерчески доступных колонок. Кроме того, разработано много новых видов колонок для конкретных приложений, для ускорения процесса разделения и для того, чтобы повысить безотказность работы ВЭЖХ-систем. До начала девяностых годов разработка ВЭЖХ-метода была непредсказуемой. Зачастую требовалось несколько месяцев, чтобы добиться приемлемого разделения образца. С того времени стало возможным существенное ускорение разработки метода, особенно в случае использования подходящего программного обеспечения. В то же самое время практика ВЭЖХ все больше стала проходить в нормативно-правовом поле, что замедляет утверждение разработанного метода. Все эти многочисленные и различные достижения в области ВЭЖХ и обусловили большую часть изменений в настоящем издании.

Структура этой книги, хотя и похожа на структуру второго издания, существенно переработана в свете современных исследований. В первой главе даются основы ВЭЖХ с кратким изложением того, как использование этих знаний соотносится с различными современными методами разделения. Кроме того, в первой главе приведен обзор истории ВЭЖХ. В главе второй углубленно рассмотрены основы ВЭЖХ и влияние различных экспериментальных условий на параметры разделения. Главы третья и четвертая посвящены соответственно оборудованию и детектированию. В 1979 году детекторы еще были «слабым звеном» в системе ВЭЖХ, но сегодня ши-

рокое использование диодно-матричных УФ-детекторов и масс-спектрометрического детектирования, так же как и наличие ряда детекторов специального назначения, решило эту проблему. В пятой главе описывается колонка: «сердце» всей хроматографической системы. В 1979 году у колонок существовало множество недостатков: уширение заднего фронта пика (особенно для основных образцов), нестабильность работы при повышенных температурах или ограничения по рН мобильной фазы, а также нестабильность характеристик от партии к партии. Сегодня эти проблемы встречаются *гораздо* реже. Мы теперь хорошо знаем, как эффективность изменяется в зависимости от типа колонок, и это знание позволяет нам лучше их подбирать для конкретных случаев. И, наконец, в значительной степени благодаря усовершенствованию колонки стало возможным проведение сверхбыстрых разделений (в которых время разделения составляет несколько минут или меньше) и более качественное фракционирование смесей, содержащие сотни или даже тысячи компонентов.

Шестая глава, в которой рассматриваются разделения неионных образцов на обращенных фазах, расширяет начатое во второй главе обсуждение важных приложений ВЭЖХ. Подобное рассмотрение нормально-фазовой хроматографии (НФХ) проводится в восьмой главе. При этом уделено специальное внимание хроматографии гидрофильных взаимодействий (ГИХ). В седьмой главе обсуждается разделение ионизованных и ионизируемых образцов с помощью обращенно-фазовой, ион-парной или ионообменной хроматографии. Разговор о градиентном элюировании образцов низкомолекулярных веществ начинается в девятой главе для того, чтобы им предварить обсуждение процесса разделения больших биомолекул в тринадцатой главе. Рассмотрены и двумерные разделения, приобретающие все большее значение. В десятой главе описано компьютерное моделирование хроматографических методов. Другие важные общие темы освещены в главах 11 (количественный и качественный анализ) и 12 (валидация метода).

Глава тринадцатая представляет собой введение в разделение высокомолекулярных соединений, включая как биологические, так и синтетические полимеры. Методы ВЭЖХ, используемые для этих целей, рассмотрены подробнее — обращенно-фазовая, ионообменная и эксклюзионная хроматография — а также связанные с ними двумерные разделения. В четырнадцатой главе рассматривается особый случай — разделение энантиомеров. Особый он постольку, поскольку для того, чтобы разделить энантиомеры, требуется специально подбирать колонки и условия для каждого образца. Этот подход не похож на те, что используются в большинстве ВЭЖХ приложений, описанных в предыдущих главах.

Пятнадцатая глава посвящена препаративным разделениям (преп-ЖХ), в которых на колонку вводят гораздо большие количества образца. С 1979 года в препаративной хроматографии произошли большие изменения, мы теперь гораздо лучше понимаем, как препаративные разделения зависят от изменения условий, что, в свою очередь, дает возможность более эффективно и систематически разрабатывать метод разделения. В шестнадцатой главе дается подробное введение в пробоподготовку, важный раздел ВЭЖХ. Как и в случае с другими разделами ВЭЖХ, пробоподготовка за последние тридцать лет претерпела существенные изменения, что позволило ее превратить в рутинную процедуру, служащую дополнением к методу разделения. Наконец, в семнадцатой главе рассматриваются возможные в ВЭЖХ проблемы и неисправности. Несмотря на все наши достижения в усовершенствовании оборудования, колонок, материалов и методов, гарантировать бесперебойную ВЭЖХ по-прежнему невозможно. К счастью, мы стали более осведомленными, наши знания в большей степени систематизированы и, как следствие, наши возможности предвидеть, диагностировать и решать проблемы, связанные с ВЭЖХ, увеличились. Один из трех авторов этой книги (Джон Долан) приложил большие усилия именно в этой области.

Разные читатели будут пользоваться этой книгой для решения разных задач. Тот, у которого уже есть опыт, возможно, захочет выборочно изучить нужные ему темы или станет искать ответы на конкретные вопросы. Таким читателям лучше начать знакомство с книгой с изучения предметного указателя. Начинающие могли бы сначала просмотреть главы с первой по седьмую, а затем с девятой по десятую: в них наибольшее внимание уделено обращенно-фазовой ВЭЖХ. Эта последовательность глав представляет собой в общих чертах ядро краткого курса ВЭЖХ, разработанного авторами. После такого введения читатель может перейти к главам, которые представляют для него особый интерес. Другие читатели, возможно, захотят начать чтение с конкретных тем, перечисленных в оглавлении в начале книги, и в оглавлениях, помещенных перед каждой главой. Книга так построена, что возможны разные варианты ее прочтения.

Третье издание насыщено перекрестными ссылками с тем, чтобы позволить читателю следовать за интересующей его темой или прояснить вопросы, возникающие по ходу чтения. Поскольку большое количество перекрестных ссылок может отвлекать, то зачастую рекомендуется их просто игнорировать (или откладывать, что называется, на потом), чтобы не прыгать из одной главы в другую. Некоторые главы содержат разделы, в которых детально рассматриваются те или иные вопросы. Это может быть несколько в стороне от непосредственного интереса читателя, и потому такие разделы выделены курсивом, чтобы читатель мог их пропустить. Кроме того, мы свели определения всех символов, встречающихся в книге, в глоссарий и составили всеобъемлющий предметный указатель. Наконец, следует обратить внимание на «наиболее оптимальные методики» в предметном указателе, в которых объединены различные рекомендации как для разработки метода, так и для рутинных методик.

Мы высоко ценим вклад, который внесли в создание настоящей книги восемь наших коллег: Петер Шонмэйкерс (разделы 9.3.10, 13.10), Майк Шварц (глава 12), Тим Вэр (разделы 13.1—13.8), Карл Сканделла (раздел 13.9), Вольфганг Линднер, Михаэль Лэммерхофер и Норберт Майер (глава 14), Джефф Кокс (глава 15) и Рон Мэйджорс (глава 16). Они сотрудничают в следующих организациях:

Петер Шонмэйкерс	University of Amsterdam
Майк Шварц	Synomics Pharma
Тим Вэр	BioRad Corp.
Карл Сканделла	Consulting (4404 91st Avenue NE Bellevue, WA 98004)
Вольфганг Линднер, Михаэль Лэммерхофер и Норберт Майер	University of Vienna
Джефф Кокс	Chiral Technologies
Рон Мэйджорс	Agilent Technologies

Мы признательны рецензентам различных частей этой книги: Питеру Карру, Тому Чэмберсу, Джеффу Коксу, Рою Экстену, Джону Фетцеру, Дику Хенри, Владимиру Иоффе, Павлу Жандере, Питеру Джонсону, Тому Жупиль, Рону Мэйджорсу, Дэну Марчанду, Дэвиду МакКэлли, Имре Мольнару, Тому Моурей, Уве Нойе, Рави Равичандрану, Карен Руссо, Карлу Сканделле, Питеру Шонмэйкерсу и Лорен Рислей. Тем не менее за все ошибки и недочеты в книге авторы берут ответственность на себя.

Ллойд Р. Снайдер  
Дж. Дж. (Джек) Киркленд  
Джон В. Долан

*Оринда. Калифорния  
Уилмингтон, Делавэр  
Амити, Орегон*

# СЛОВАРЬ СИМВОЛОВ И ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Этот раздел состоит из двух частей: основные символы и второстепенные символы. Большинство обозначений, представляющих интерес, включены в список основных символов. Уравнения, служащие определением данного символа, указаны рядом с этим символом. Например, указание «уравнение (2.18)» отсылает к уравнению (2.18) главы 2. Приведены единицы измерения для всех обозначений, используемых в данной книге.

## Основные символы и принятые сокращения

A (%A)	«слабый» компонент бинарной подвижной фазы (A/B) и его объемный процент; в обращенно-фазовой хроматографии растворитель A представляет собой воду или водный буфер; также силикагель типа A (старый, более кислотный силикагель)
ACN	ацетонитрил
B (%B)	«сильный» компонент (и его объемный процент) в бинарной подвижной фазе (A/B); в обращенно-фазовой хроматографии растворитель B представляет собой органический растворитель, такой как ацетонитрил; также силикагель типа B (современный, менее кислотный силикагель, раздел 5.2.2.2)
CV	коэффициент вариации (эквивалентный относительно стандартному отклонению, OCO), раздел 4.2.3.2
C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub>	обозначение обращенно-фазового лиганда, показывает длину алкильных цепочек, привитых к поверхности сорбента
d <sub>c</sub>	внутренний диаметр колонки (мм)
d <sub>p</sub>	диаметр частиц сорбента (мкм)
F	объемная скорость подвижной фазы, скорость потока (мл/мин)
H	высота теоретической тарелки (равная L/N) раздел 2.4; см. также «менее часто используемые символы»
k	фактор удерживания (то же самое, что и коэффициент емкости k'); равен (t <sub>R</sub> /t <sub>0</sub> ) - 1, раздел 2.3.1
k*	градиентный фактор удерживания; уравнение (9.5), раздел 9.2
L	длина колонки (мм)
M	молекулярная масса (Da)
MeOH	метанол
N	число теоретических тарелок, уравнение (2.9), раздел 2.4
n <sub>c</sub>	«эквивалентная» пиковая емкость, обычно именуемая «условной» или «пиковой емкостью образца» $n_c = PC (t_Z - t_A)/t_G$ , раздел 9.3.9
P	перепад давления на колонке (psi); 1 бар или 1 атм = 14,7 psi; 1 МПа = 10 бар = 147 psi; также коэффициент распределения вещества между различными растворителями (partition coefficient), раздел 6.2.2
PC	пиковая емкость; уравнение (2.30), рис. 2.26a (изократика); уравнение (9.20), рис. 9.20 (градиент)
pK <sub>a</sub>	логарифм константы ионизации кислоты или основания (-log K <sub>a</sub> ); уравнения (7.2), (7.2a), раздел 7.2

$R_F$	относительное перемещение зон (пятен) вещества в ТСХ; уравнение (8.6), рис. 8.8, раздел 8.2.3
$R_s$	разрешение; уравнение (2.23), раздел 2.5
$S$	наклон прямой в координатах $\log k, \varphi$ ( $d \log k / d \varphi$ ); уравнение (2.26), раздел 2.5.1
$T$	температура ( $^{\circ}\text{C}$ )
$t_D$	время задержки (мин); эквивалентно $V_D/F$ , рис. 3.26, раздел 3.10.1.2
$TF$	фактор размывания заднего фронта пика (tailing factor), рис. 2.16а, раздел 2.4.2
$t_G$	время градиента (мин)
$t_0$	«мертвое» время колонки (мин); также время удерживания неударживаемого анализируемого вещества; эквивалентно $V_m/F$ ; уравнения (2.4а), (2.7), раздел 2.3.1
$t_R$	время удерживания (мин); уравнение (2.5), раздел 2.3.1
UV	поглощение в ультрафиолетовой области спектра
$V_c$	объем колонки (мл)
$V_D$	приборный объем задержки, $V_D = t_D F$ , раздел 9.2.2.4
$V_m$	«мертвый» объем колонки; объем подвижной фазы внутри колонки (мл); уравнение (2.7а), раздел 2.3.1
$V_R$	объем удерживания анализируемого вещества (мл); равен $t_R F$
$W$	ширина пика при основании; рис. 2.10, раздел 2.4
$w_{max}$	максимальная масса образца, которую можно нанести на колонку без ее перегрузки, раздел 2.6.3
$w_s$	емкость насыщения колонки (г), раздел 15.3.1.1
$w_x$	масса наносимого вещества (г), раздел 15.3.1.2
$\alpha$	коэффициент селективности (фактор разделения); уравнение (2.24а), раздел 2.5
$\Delta\varphi$	изменение $\varphi$ в течение градиента; рис. 9.2, раздел 9.1.2
$\epsilon$	элюирующая сила подвижной фазы в НФХ; уравнения (8.2), (8.5); также диэлектрическая постоянная
$\epsilon^0$	значение $\epsilon$ (в НФХ) для чистого растворителя
$\varphi$	объемная доля элюента В (равна $0,01 \times \% \text{В}$ )
$\varphi^*$	значение $\varphi$ в градиентной хроматографии, когда зона вещества достигает середины колонки
$v$	приведенная скорость; уравнение (2.18а), раздел 2.4.1.1
$\eta$	вязкость подвижной фазы (сП)
АХИМ	аффинная хроматография на сорбентах с иммобилизованными металлами (immobilized-metal affinity chromatography, IMAC) или металл-аффинная хроматография, раздел 13.4.2.5
ВАХ	высокоэффективная анионообменная хроматография (high-performance anion-exchange chromatography, HPAE), раздел 13.6.3
ВПМС	времяпролетный масс-спектрометр (timeofflight (TOF) MS-detector), раздел 4.14.3
ГИХ	хроматография гидрофильных взаимодействий (hydrophilic interaction chromatography, HILIC) раздел 8.6
ГИХЭО	хроматография гидрофильных взаимодействий с электростатическим отталкиванием (electrostatic-repulsion hydrophilic-interaction chromatography, ERLIC), раздел 13.4.4.4
ГПХ	гель-проникающая хроматография (gel-permiation chromatography, GPC), раздел 13.10.3.1

ГФХ	гель-фильтрационная хроматография (gel-filtration chromatography) или эксклюзионная хроматография ЭХ, раздел 13.8
ДПП	детектор показателя преломления или рефрактометр (refractive index, RI detector), раздел 4.11
ЖХ	жидкостная хроматография
ЖХ-МС	жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS), раздел 4.14
ИАД	импульсное амперометрическое детектирование (pulsed-ampereometric detection, PAD), раздел 13.6.3
ИДС	испарительный детектор светорассеяния (evaporative light-scattering detector, ELSD), раздел 4.12.1
и-ЖХ	интерактивная жидкостная хроматография (interactive LC), раздел 13.10.3.2
ИКФП	инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) или соответствующий спектрометр; раздел 4.15.1
ИОХ	ионообменная хроматография (ion-exchange chromatography, IEC), раздел 7.5
ИПР	ион-парный реагент
ИПХ	ион-парная хроматография (ion-pair chromatography, IPC), раздел 7.4
КФГ	клапаны, формирующие градиент (для систем ВЭЖХ со смешиванием при низком давлении), раздел 3.10.1.2
ЛДС	лазерный детектор светорассеяния (laser light-scattering detector, LLSD), раздел 4.12.3
МЖХ	многомерная жидкостная хроматография (multidimensional liquid chromatography, MDLC), раздел 13.4.5, и 2D-ЖХ для двумерного разделения, раздел 9.3.10
МС/МС-детектор	детектор с тандемной масс-спектрометрией (triple-quadrupole mass spectrometer), раздел 4.12.2, или с другими сочетаниями нескольких МС-анализаторов
НОФХ	неводная обращенно-фазовая хроматография (nonaqueous RPC, NARP), раздел 6.5
НПД	нижний предел детектирования, раздел 4.2.4; иногда называется пределом обнаружения, ПО, раздел 11.2.5
НПКО	нижний предел количественного определения, раздел 4.2.4, или предел количественного определения, ПКО, раздел 11.2.5
НФХ	нормально-фазовая хроматография (normal-phase chromatography, NPC), глава 8
ОК	операционная квалификация (operational qualification) — тестирование новой системы ВЭЖХ на соответствие техническим характеристикам, указанным производителем, раздел 3.10.1.1
ОСО	относительное стандартное отклонение или СО (relative standard deviation, RSD), что эквивалентно относительному среднеквадратичному отклонению (СКО)
ОФХ	обращенно-фазовая хроматография (reversed-phase chromatography, RPC), глава 6
ПАВ	поверхностно-активные вещества
ПЛ	поляриметр (polarimeter, PL), раздел 4.10
ПП	показатель преломления (refractive index, RI)
преп-ЖХ	препаративная жидкостная хроматография, глава 15
ПС-ДВБ	полистирол-дивинилбензол (PS-DVB)
СКО	относительное среднеквадратичное отклонение, эквивалентно ОСО
С-П-разделение	разделение соприкасающихся пиков (touching-peak separation), раздел 15.1.2
ТБА	тетрабутиламин (ТБА)
типа А	старый, более кислотный силикагель, раздел 5.2.2.2
типа В	новый, менее кислотный силикагель, раздел 5.2.2.2

ТФУК	трифторуксусная кислота (TFA)
ТФЭ	твердофазная экстракция (solid-phase extraction, SPE), раздел 16.6
ТЭА	триэтиламин (ТЕА)
УВЭЖХ	ультравысокоэффективная жидкостная хроматография (ultra-high-pressure liquid chromatography, U-HPLC)
УК	установочная квалификация (installation qualification) — тестирование новой системы ВЭЖХ на соответствие установки системы условиям, указанным производителем, раздел 3.10.1.1
УФ	ультрафиолетовый (область спектра, детектирование по поглощению в этой области и т.д.)
ХГВ	хроматография гидрофобных взаимодействий (hydrophobic interaction chromatography, HIC), раздел 13.4.3
ХЛОХ	хиральная лигандообменная хроматография (chiral ligand-exchange chromatography, CLEC), раздел 14.6.9
ХНФ	хиральная неподвижная фаза, глава 14
ЭК	эксплуатационная квалификация (performance qualification) — разработанная пользователем совокупность тестов для проверки работы системы ВЭЖХ, раздел 3.10.1.1
ЭХ	эксклюзионная хроматография (size-exclusion chromatography, SEC) или гель-фильтрационная хроматография, ГФХ, раздел 13.8
ЭХ-детектор	электрохимический (амперометрический) детектор (electrochemical, EC (amperometric) detector), раздел 4.6

## Менее часто используемые (или менее общеупотребительные) символы и аббревиатуры

<i>A</i>	поглощение
<i>A</i>	кислотность водородных связей сорбента колонки; уравнение (5.3), раздел 5.4.1.1
AAPS	Американская ассоциация ученых-фармацевтов (American Society of Pharmaceutical Scientists), глава 12
АОАС	Ассоциация химиков-аналитиков, состоящих на государственной службе (Association of Official Analytical Chemists), глава 12
<i>A<sub>s</sub></i>	коэффициент/фактор асимметрии пика (peak asymmetry factor), рис. 2.16а, раздел 2.4.2
AU	единицы абсорбции (детектирование по УФ); по-русски е.п. (единицы поглощения), раздел 4.4
<i>b</i>	параметр крутизны градиента; уравнение (9.4), раздел 9.1.3.1
<i>B</i>	основность водородных связей сорбента колонки; уравнение (5.3), раздел 5.4.1.1
<i>C</i>	ионообменная емкость колонки, характеризующая электростатические взаимодействия сорбента с анализируемым веществом; уравнение (5.3), раздел 5.4.1.1
<i>C<sub>m</sub></i>	концентрация анализируемого вещества в подвижной фазе
cGMP	современная надлежащая производственная практика (current Good Manufacturing Practice), глава 12
<i>C<sub>s</sub></i>	концентрация анализируемого вещества в стационарной фазе
2D-ГЭ	двумерный гель-электрофорез (two-dimensional gel electrophoresis, 2D-GE), раздел 13.4.5
2D-ЖХ	двумерное разделение (two-dimensional separation, 2D-LC), раздел 9.3.10

$D_m$	коэффициент диффузии вещества ( $\text{см}^2/\text{с}$ ); уравнение (2.19), раздел 2.4.1.1
EPA	Агентство по охране окружающей среды, США (Environmental Protection Agency), глава 12
$F_{opt}$	оптимальная объемная скорость подвижной фазы (мл/мин), раздел 2.4.1
$F_s$	функция сравнения колонок; уравнение (5.4), раздел 5.4.2
$F_s(-C)$	значение $F_s$ для неионизированных образцов; уравнение (6.3), раздел 6.3.6.1
FDA	Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США (US Food and Drug Administration), глава 12
$G$	коэффициент сжатия пика в градиенте; уравнение (9.15a), раздел 9.2.4.3
$H$	гидрофобность колонки; уравнение (5.3), раздел 5.4.1.1
$h$	приведенная высота теоретической тарелки; уравнение (2.18), раздел 2.4.1.1
$h_p$	высота пика
ICH	Международный совет по гармонизации технических требований к регистрации фармацевтических продуктов, предназначенных для применения человеком, США (International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals in Human Use), глава 12
ISO	Международная организация по стандартизации (International Organization for Standardization), глава 12
ISPE	Международное общество фармацевтической инженерии (International Society for Pharmaceutical Engineering), глава 12
$K$	коэффициент распределения анализируемого вещества между неподвижной и подвижной фазами (называемый также постоянной Генри) в уравнении (15.2) изотермы адсорбции Ленгмюра, равный ( $C_s/C_m$ ), раздел 15.3.1.1
$K_D$	коэффициент распределения в ЭХ; рис. 13.39; также коэффициент распределения в законе распределения Нернста, уравнение (16.1)
$k_{EB}$	значение $k$ этилбензола (для различных колонок при стандартных условиях); уравнение (5.3), раздел 5.4.1.1
$k_w$	экстраполированные значения $k$ веществ, когда подвижная фаза вода (или водный буфер); уравнение (2.26), раздел 2.5
$k_0$	значение $k$ вещества на старте градиентного элюирования, раздел 9.2.4.1
mAU	милли единицы абсорбции (детектирование по поглощению в УФ)
$m/z$	отношение массы молекулы к ее заряду
$N^*$	эффективное число теоретических тарелок при градиентном элюировании, раздел 9.2.4.4
$P$	мера общей полярности растворителя, раздел 2.3.2.1, таблица 2.3
PhRMA	Американская ассоциация фармацевтических исследователей и производителей (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America), глава 12
QuEChERS	технология экстракции для пробоподготовки образцов к анализу на содержание пестицидов (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe), раздел 16.6.7.5
$R$	доля молекул анализируемого вещества в подвижной фазе, раздел 2.3
$R^+$	катионный реагент для ИПХ или катионная группа анионообменника, раздел 7.4
$R^-$	анионный реагент для ИПХ или анионная группа катионообменника, раздел 7.4
$R^\pm$	обозначает либо $R^+$ , либо $R^-$
$S^*$	характеристика стерических взаимодействий сорбента колонки с анализируемым веществом; уравнение (5.3), раздел 5.4.1.1 (сопротивление неподвижной фазы проникновению объемных молекул анализируемого вещества)
SDS PAGE	гель-электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, раздел 13.4.5

$S/N$	отношение сигнал/шум, раздел 4.2.3.2
$T_K$	температура (в градусах Кельвина)
TOF	времяпролетный (масс-спектрометр) (timeofflight MS-detector), раздел 4.14.3
$u$	линейная скорость подвижной фазы (мм/мин)
$u_e$	скорость подвижной фазы между частицами сорбента или интерстициальная скорость подвижной фазы (мм/мин); $u_e > u$ , раздел 2.4.1.1
$u_x$	скорость полосы анализируемого вещества при перемещении по колонке (мм/мин)
USP	Фармакопея США (United States Pharmacopeia)
$V_G$	объем градиента (равен $t_G F$ ) (мл)
$V_M$	объем смешивания оборудования при градиентном элюировании (мл), раздел 9.2.2.4
$V_p$	объем пика (мл)
$V_S$	объем образца, наносимого на колонку; уравнение (2.29а), раздел 2.6.1; также объем стационарной фазы в колонке (мл)
$W_0$	значение $W$ в отсутствие внеколоночного размывания пика, раздел 2.4.1.1
$W_{1/2}$	ширина пика на полувысоте; рис. 2.10а, раздел 2.4
$X$	молярная доля
$\alpha^*$	коэффициент селективности (фактор разделения) в градиентном элюировании, раздел 9.2.4.4
$\alpha'$	кислотность водородных связей молекул анализируемого вещества и сорбента; уравнение (5.3), раздел 5.4.1.1
$\alpha$	кислотность водородных связей между подвижной фазой и анализируемым веществом, раздел 2.3.2.1
$\beta$	основность водородных связей между подвижной фазой и анализируемым веществом, раздел 2.3.2.1
$\beta'$	основность водородных связей молекул анализируемого вещества и сорбента; уравнение (5.3), раздел 5.4.1.1
$\Delta t_R$	разность времен удерживания компонентов анализируемого образца в градиенте; рис. 9.15, раздел 9.3.1.1
$\epsilon$	диэлектрическая постоянная; также молярный коэффициент экстинкции
$\epsilon_e$	пористость сорбента (объем между частицами), раздел 2.4.1.1
$\epsilon_i$	пористость частиц сорбента (объем пор частиц), раздел 2.4.1.1
$\epsilon_T$	общая пористость колонки, раздел 2.4.1.1
$\Phi_f$	конечное значение $\Phi$ в градиентном разделении; уравнение (9.2а)
$\Phi_0$	исходное значение $\Phi$ в градиентном разделении; уравнение (9.2а)
$\eta'$	гидрофобность молекул анализируемого вещества во взаимодействии с сорбентом; уравнение (5.3), раздел 5.4.1.1
$\kappa'$	эффективный ионный заряд молекул анализируемого вещества во взаимодействии с сорбентом; уравнение (5.3), раздел 5.4.1.1
$\pi^*$	полярность подвижной фазы, раздел 2.3.2.1
$\sigma$	стандартное отклонение гауссовой кривой; уравнение (2.9б), раздел 2.4
$\sigma'$	объемность молекул анализируемого вещества во взаимодействии с сорбентом; уравнение (5.3), раздел 5.4.1.1
$\Sigma$	сумма значений $\alpha$ , $\beta$ и $\pi^*$ подвижной фазы, раздел 2.3.2.1
$\Psi$	фазовое отношение, равно $V_S/V_m$ , раздел 2.3.1

АФИ	активный фармацевтический ингредиент (фармацевтическая субстанция, ФС), глава 12
ВС	водородная связь
ВПКО	верхний предел количественного определения, раздел 11.2.5
ВЭ-ТСХ	высокоэффективная ТСХ
ГХ	газовая хроматография (gas chromatography, GC)
ГФМК	гептафтормасляная кислота (HFBA)
Да	Дальтон (атомная единица массы или углеродная единица, внесистемная единица, применяемая для оценки масс молекул, атомов, атомных ядер)
ДЗА	детектор заряженных аэрозолей (также называемый детектором ионизации коронным разрядом; corona-discharge detector, CAD), раздел 4.13
ДМД	диодно-матричный УФ-детектор (или детектор с фотодиодной матрицей; diode-array detector, DAD), раздел 4.4.3
ДМСО	диметилсульфоксид (DMSO)
ДОВ	детектор дисперсии оптического вращения (optical rotary dispersion detector, ORD), раздел 4.10
ДСН	додецилсульфат натрия (SDS)
ДСЦК	детектор светорассеяния на центрах (ядрах) конденсации (condensation nucleation light-scattering detector, CNLSD), раздел 4.12.2
ДТМ	диспергирование твердой матрицы для экстракции из твердых образцов (matrix solid-phase dispersion, MSPD); таблица 16.9, раздел 16.8
ЖЖЭ	экстракция в системе жидкость — жидкость (liquid–liquid extraction, LLE), раздел 16.5
ЖМЭ	жидкофазная микроэкстракция (liquid-phase microextraction, LPME), раздел 16.5.4.2
ЖЭД	жидкостная экстракция под давлением (pressurized liquid extraction, PFE), называемая также ускоренной экстракцией растворителем, УСЭР (accelerated solvent extraction, ASE), раздел 16.8.2.3
ИДУК	иминодиуксусная кислота (IDA)
ИЖЭ	жидкостная экстракция на иммобилизованном носителе (immobilized liquid extraction, ILE), раздел 16.5.4.4
ИПС	изопропиловый спирт, изопропанол (IPA)
КД	детектор кругового дихроизма (circular dichroism (CD) detector), раздел 4.10
КК	контроль качества (quality control, QC), глава 12
КЭ	капиллярный электрофорез (capillary electrophoresis, CE)
КЭХ	капиллярная электрохроматография (capillary electrochromatography, CEC)
ЛИУС	Лабораторная информационно-управляющая система (Laboratory Information Management System, LIMS), раздел 3.8.1
МБТЭ	метил-трет-бутиловый эфир (МТБЕ)
МИП	молекулярно-импринтированные полимеры (molecular-imprinted polymer, MIP), раздел 16.6.7.3
ММР	молекулярно-массовое распределение (molecular-weight distribution, MWD), раздел 13.10.2
МОК	микроэкстракция методом одной капли (single-drop microextraction, SDME), раздел 16.5.4.2
МЭ	экстракция с микроволновым нагреванием (microwave-assisted extraction, MAE), раздел 16.8.2.4

НМП	наконечник микропипетки для микроэкстракции (micropipette tip, МПТ), раздел 16.6.3.3
НФ	нормально-фазовый (только для разделений на ХНФ), глава 14
ОДП	адсорбенты с ограниченно доступной поверхностью (restricted access media, RAM), раздел 16.6.7.2
ОФ	обращенно-фазовый (только для разделений на ХНФ), глава 14
ПАУ	полициклические ароматические углеводороды (ПАУ)
ПВХ	поливинилхлорид (PVC)
ПКО	предел количественного определения, раздел 11.2.5, называемый также нижним пределом количественного определения, НПКО
ПО	предел обнаружения, раздел 11.2.5; также полярно-органический режим элюирования (только в разделениях на ХНФ), раздел 14.6.1
ПТМ	посттрансляционная модификация (post-translational modification), глава 13
ПТФЭ	политетрафторэтилен (PTFE)
ПТХ	противоточная хроматография (counter current chromatography, CCC), раздел 1.3.5
ПЭЭК	полиэфирэфиркетон (PEEK)
РХС	распределение по химическому составу (chemical-composition distribution, CCD), раздел 13.10.2
СОП	стандартная операционная процедура, глава 12
СФХ	сверхкритическая флюидная хроматография (supercritical fluid chromatography, SFC)
СФЭ	сверхкритическая флюидная экстракция (supercritical fluid extraction, SFE), раздел 16.8.2.2
ТГФ	тетрагидрофуран (THF)
ТКМЭДА	трис(карбоксиметил)этилендиамин (TED)
ТМА	передача (трансфер) методики анализа (analytical method transfer, АМТ), глава 12
ТМКЦ	триацетат микрокристаллической целлюлозы (хиральная неподвижная фаза), раздел 14.6.1
ТСХ	тонкослойная хроматография (thin-layer chromatography, TLC)
ТФЖЖЭ	экстракция в системе жидкость — жидкость на твердой фазе (solid-supported liquid-liquid extraction, SLE), раздел 16.5.4.3
ТФМЭ	твердофазная микроэкстракция (solid-phase microextraction, SPME), раздел 16.6.3.3
ТЭАФ	триэтиламония фосфат (TEAP)
УФЦ	ультрафильтрация (ultrafiltration), раздел 16.10
ФКБ	фенилборная кислота (РВА)
ФС	фармацевтическая субстанция (или активный фармацевтический ингредиент, АФИ), глава 12
ХДА	хиральный дериватирующий агент (chiral derivatizing reagent, CDR), раздел 14.3
ХДПФ	хиральные добавки к подвижной фазе (chiral mobile-phase-additive, СМПА), раздел 14.4
ХЛАД	хемилюминесцентный азотный детектор (chemiluminescent nitrogen detector, CLND), раздел 4.9
ХС	хиральный селектор, хиральный комплексообразующий агент, раздел 14.4
ЦД	циклодекстрин (CD), раздел 14.6.4
ЭАС	экстракция в автоматизированном аппарате Сокслета (automated Soxhlet extraction, ASE), раздел 16.8.2.1
ЭДТА	1,2-этилендиамин- <i>N,N,N',N'</i> -тетрауксусная кислота (EDTA)

# ГЛАВА I

## ВВЕДЕНИЕ

1.1. Предварительные сведения . . . . .	42
1.1.1. Что такое ВЭЖХ? . . . . .	42
1.1.2. Каковы возможности ВЭЖХ? . . . . .	45
1.2. Небольшой экскурс в историю ВЭЖХ . . . . .	47
1.3. Некоторые альтернативы ВЭЖХ. . . . .	50
1.3.1. Газовая хроматография (ГХ) . . . . .	50
1.3.2. Тонкослойная хроматография (ТСХ) . . . . .	50
1.3.3. Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ). . . . .	50
1.3.4. Капиллярный электрофорез (КЭ). . . . .	51
1.3.5. Противоточная хроматография (ПТХ) . . . . .	51
1.3.6. Специальные виды ВЭЖХ . . . . .	52
1.4. Другие источники информации о ВЭЖХ . . . . .	52
1.4.1. Книги . . . . .	52
1.4.2. Журналы . . . . .	54
1.4.3. Обзоры . . . . .	54
1.4.4. Краткие курсы. . . . .	54
1.4.5. Интернет . . . . .	54
Литература . . . . .	54

**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)** — один из нескольких хроматографических методов, позволяющий проводить разделение и анализ смесей химических соединений (раздел 1.3). Среди других способов разделения ВЭЖХ занимает особую нишу. Ее уникальность заключается в следующем:

- практически полная универсальность, только лишь небольшое количество образцов не поддаются разделению методом ВЭЖХ;
- впечатляющая прецизионность измерений ( $\pm 0,5\%$ , а в большинстве случаев еще и точнее);
- большой выбор оборудования, колонок и других сопутствующих компонентов, позволяющих с помощью ВЭЖХ решить практически любую задачу;
- подавляющее большинство лабораторий, которые имеют дело с анализом химических смесей, оснащены оборудованием для ВЭЖХ, это первое, что покупают в лабораторию.

В настоящее время ВЭЖХ является наиболее используемым и широкоприменяемым методом анализа. Масс-спектрометрия конкурирует с ВЭЖХ и во многом дополняет ее. В сущности, оба этих метода уже применяют в комплексе (ЖХ-МС) (раздел 4.14). В будущем значение такого сочетания будет расти.

В данной главе будут:

- изложены некоторые общие особенности ВЭЖХ
- обобщена история ВЭЖХ
- очень кратко рассмотрены альтернативы ВЭЖХ и их конкретные области применения
- приведен список дополнительных источников информации о ВЭЖХ

## 1.1. Предварительные сведения

### 1.1.1. Что такое ВЭЖХ?

Жидкостная хроматография появилась в начале 1900-х (рис. 1.1а-д) и в настоящее время известна как «классическая колоночная хроматография». В стеклянный цилиндр помещали мелко измельченный порошок, например, мел (рис. 1.1а), сверху в колонку на слой порошка наносили образец (рис. 1.1б) и наливали растворитель (рис. 1.1в). Под действием гравитации растворитель проходил через слой сорбента в колонке (рис. 1.1г), а компоненты образца (А, Б и В) вслед за растворителем начинали перемещаться с разной скоростью. Таким образом происходило разделение. Изначально процесс разделения исследовали на цветных образцах, поскольку их перемещения по колонке можно было наблюдать визуально. Затем растворитель, вытекающий из колонки, собирали порциями, упаривали и проводили количественный анализ полученных компонентов образца или использовали в других целях (рис. 1.1д). В те далекие времена для разделения каждого образца требовалась отдельная колонка, а сам процесс проводили вручную (а не в автоматическом режиме). Поэтому разделение было трудоемким и отнимало много времени. Тем не менее, даже на том этапе развития хроматография предоставляла уникальные возможности по сравнению с другими методами анализа химических смесей.

Более простой вид жидкостной хроматографии, названный *бумажной хроматографией* (рис. 1.1е), появился в 1940-х. Полоска бумаги заменила колонку, изображенную на рис. 1.1а. Образец наносится на нижний край бумажной полосы, которую затем помещают в камеру, содержащую на дне растворитель. Благодаря капиллярным силам растворитель перемещается вверх по полосе бумаги и происходит разделение, аналогичное процессу, изображенному на рис. 1.1г, только в противоположном направлении. Позже такой «открытый» вид хроматографии модифицировали и стали вместо бумажной полоски, используемой в бумажной хроматографии, наносить тонкий слой порошкообразного силикагеля на стеклянную подложку. Так появилась *тонкослойная хроматография* (ТСХ)<sup>1</sup>. К преимуществам бумажной и тонкослойной хроматографии относятся (1) удобство, (2) возможность одновременно разделять несколько образцов на одной и той же полоске бумаги или пластине и (3) простота обнаружения небольших количеств разделяемых веществ благодаря использованию колориметрических реагентов уже после завершения разделения.

Вершиной развития современной жидкостной хроматографии стала ВЭЖХ (рис. 1.1ж,з). Хроматографист начинает анализ с того, что помещает образцы в лоток автоматического инжектора (автосамплера), из которого они попадают в колонку (рис. 1.1ж). Насос непрерывно прокачивает элюент через колонку. Разделенные компоненты образца покидают колонку и регистрируются детектором. Зависимость интенсивности сигнала от времени представляет собой *хроматограмму* (рис. 1.1з), которую можно сравнить с результатом разделения, изображенным на рис. 1.1д (при условии идентичности состава образца А+Б+В и параметров разделения). Компьютер полностью контролирует процесс разделения, от оператора требуется только поместить образец в лоток автоматического инжектора. Кроме того, компьютер сам для каждого образца может сформировать отчет об анализе образца. Помимо полностью автоматизированного процесса, в ВЭЖХ используются насосы высокого давления, что позволяет ускорить разделение, многоразовые и более эффективные колонки, что повышает качество разделения, и надлежащий контроль всего процесса

<sup>1</sup>Тонкослойную хроматографию в 1938 году предложили Н.А. Измайлов и М.С. Шрайбер. См. Измайлов Н.А., Шрайбер М.С. Фармация, 1938, № 3. — С. 1—7. — *Прим. перев.*

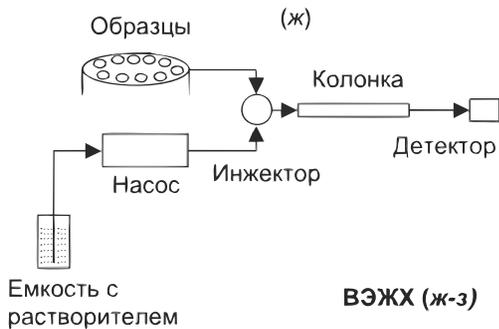
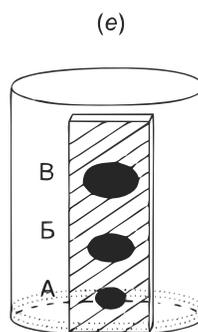
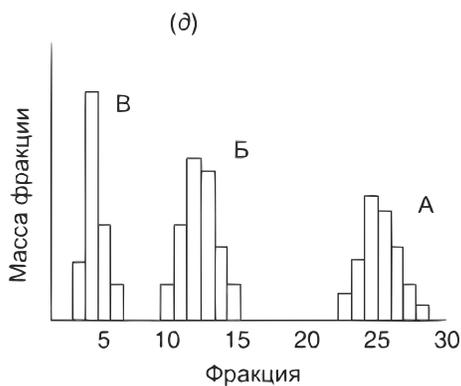
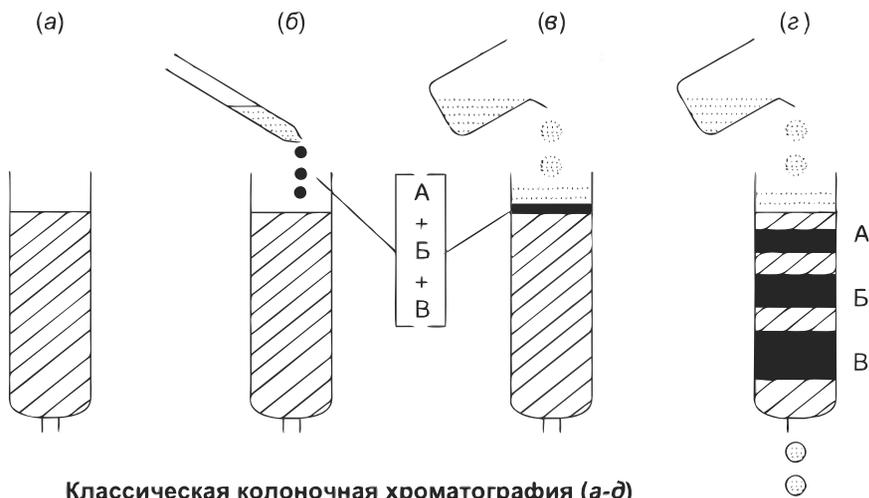
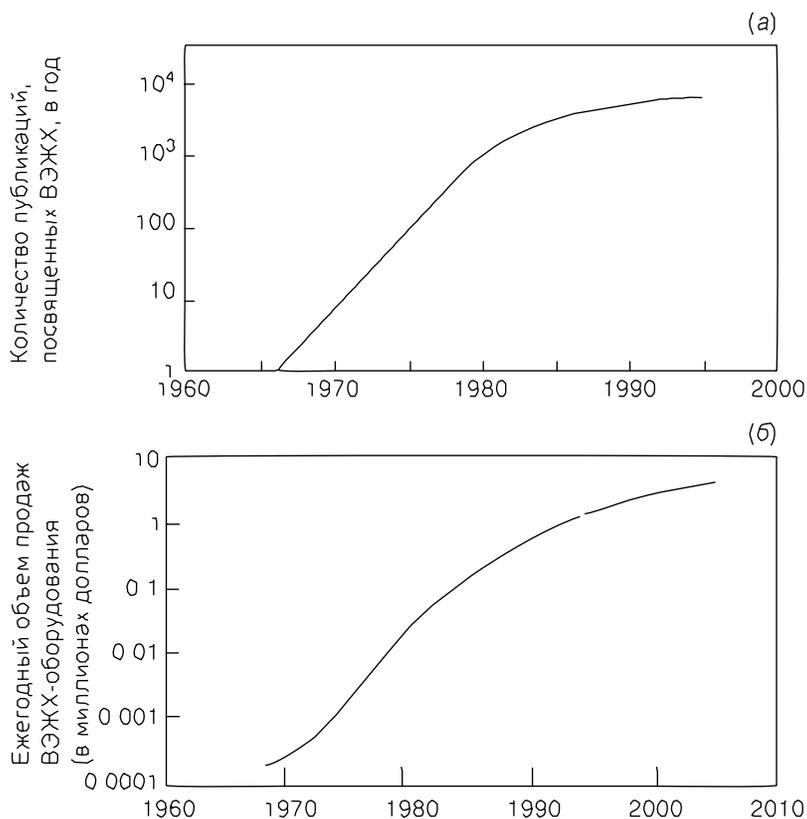


Рис. 1.1. Этапы развития хроматографии

разделения, обеспечивающий более прецизионные и воспроизводимые результаты. Более подробная информация об истории ВЭЖХ изложена в разделе 1.2.

С появлением ВЭЖХ в конце 1960-х начинается ее развитие (раздел 1.2). На рис. 1.2а показано ежегодное количество публикаций, посвященных ВЭЖХ. Первая статья появилась в 1966 [2]. Затем число статей каждый год росло экспоненциально и достигло постоянного значения только в конце 1980-х. К 1990-м годам удалось достичь понимания процесса разделения, стали доступны необходимые оборудование и колонки. В настоящее время ВЭЖХ можно рассматривать как зрелый метод анализа, которым теперь пользуются во всем мире. В то же время новые специализированные приложения для ВЭЖХ продолжают появляться и после 1990 года. Постоянное внимание уделяется оставшимся пробелам в нашем понимании сути процесса, которое теперь вряд ли уже кардинально поменяется.

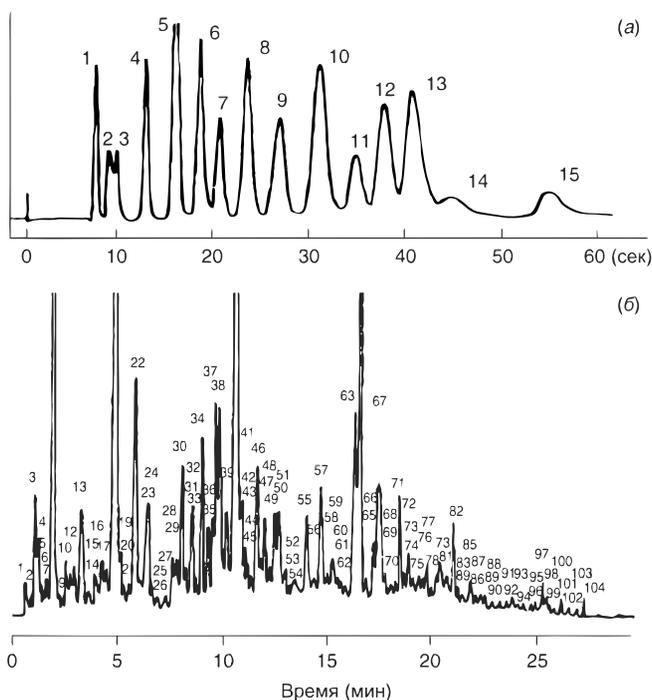
Хотя к 1990 году количество исследований, посвященных ВЭЖХ, перестало расти, на аналогичную стабилизацию экономики ВЭЖХ ушло немного больше времени, что подтверждает график (рис. 1.2б) зависимости ежегодных расходов от времени для всех продуктов ВЭЖХ (без учета инфляции). Ежегодные затраты на ВЭЖХ в настоящее время превышают затраты на любую другую аналитическую технику.



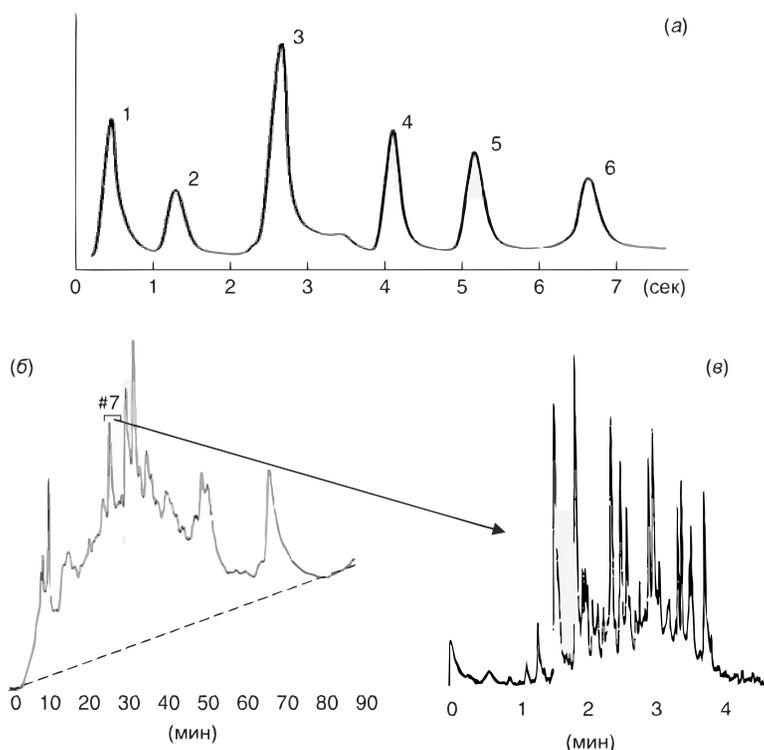
**Рис. 1.2.** Растущая актуальность исследований в области ВЭЖХ и прикладных работ, начиная с 1966 г. (а) Количество публикаций, посвященных ВЭЖХ, в год [1]; (б) общий объем продаж ВЭЖХ оборудования и сопутствующих материалов в год (приблизительные значения на основе различных источников)

### 1.1.2. Каковы возможности ВЭЖХ?

Во втором издании этой книги, которое вышло в свет в 1979 году, были опубликованы некоторые примеры возможностей ВЭЖХ. Два из них приведены и в этой книге (рис. 1.3). На рис. 1.3*а* изображено экспресс-разделение 15 соединений продолжительностью 1 минута. В другом примере (рис. 1.3*б*) на неполное разделение более чем 100 пиков потребовалось всего лишь 30 мин. Для сравнения на рис. 1.4 представлены разделения, проведенные спустя 25 лет. Обратите внимание на первую хроматограмму (рис. 1.4*а*), на которой за 7 секунд удалось разделить 6 белков, а на разделение более 1000 пептидов и белков (рис. 1.4*б,в*) ушло всего 1,5 часа. Улучшение разделения, наблюдаемое на рис. 1.4*а* в сравнении с 1.3*а*, удалось получить благодаря нескольким факторам, часть из которых обсуждается в разделе 1.2. Разделение 1000 соединений (рис. 1.4*б,в*) проводили с помощью так называемой двумерной хроматографии (раздел 9.3.10), смысл которой заключается в том, что сначала образец фракционируют на одной колонке, а потом полученные фракции разделяют на второй колонке. В этом примере каждую фракцию с первой колонки собирали в течение 4 минут, затем делили на второй колонке. На рис. 1.4*в* показано разделение фракции 7. Общее количество (распознаваемых) пиков в образце получили, просуммировав пики индивидуальных веществ, присутствующие в каждой фракции. Огромный прогресс, достигнутый в производительности ВЭЖХ за предыдущие 25 лет (сравните рис. 1.3 и 1.4), позволяет предположить, что в ближайшие годы вряд ли стоит ожидать сопоставимые существенные улучшения в скорости или эффективности разделения.



**Рис. 1.3.** Примеры возможностей ВЭЖХ к середине 1970-х годов. (а) Экспресс-разделение смеси небольших молекул [3]; (б) высокоэффективное разделение образца мочи [4]. Пример (а) взят из [3], пример (б) взят из [4]



**Рис. 1.4.** Современные примеры возможностей ВЭЖХ. (а) Быстрое градиентное разделение 6 белков на колонке  $150 \times 4,6$  мм, пелликулярный сорбент с размером частиц 1,5 мкм [5]; (б) первоначальное разделение пептидов и белков, выделенных из клетки эмбрионального фибробласта человека с помощью градиентной катионообменной хроматографии; (в) дальнейшее разделение фракции 7, собранной в интервале 24—28 минут, на второй колонке с помощью градиентной обращенно-фазовой хроматографии [6]. Рисунки взяты из оригинальных статей [5, 6]

С 1979 года имели место и другие столь же значимые достижения в ВЭЖХ. Начиная с 1980-х годов появляются колонки, пригодные для разделения белков и других крупных биомолекул [7, 8], что открыло совершенно новую область применения ВЭЖХ и способствовало значительному прогрессу в области биохимии. Благодаря разработанным Пирклом и др. [9]<sup>1</sup> хиральным колонкам для разделения энантиомеров, такой же прогресс наблюдается в области фармацевтики и связанных с ней науках о жизни.

Также растет интерес к ВЭЖХ очистке веществ в крупных масштабах благодаря доступности соответствующего оборудования, глубокому пониманию того, как лучше всего провести то или иное разделение, а также вследствие ужесточения требований контрольных органов к чистоте фармацевтических препаратов.

<sup>1</sup> Впервые разделение оптических изомеров в жидкостной хроматографии продемонстрировал В.А. Даванков в 1971 году, предложив метод лигандообменной хроматографии. См. V.A. Davankov, S.V. Rogozhin. Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in  $\alpha$ -amino acid copper(II) complexes // J. Chromatogr. 1971. V. 60. P. 284—312. — Прим. перев.

## 1.2. Небольшой экскурс в историю ВЭЖХ

В разделе 1.1 описано развитие жидкостной хроматографии до появления ВЭЖХ. Чтобы заполнить все пробелы в истории ВЭЖХ до 1965 года, можно обратиться к обзорам, написанным «историком хроматографии» Лесли Эттером:

- предшественники хроматографии; разработки в период до 1900 [10, 11];
- создание хроматографии М.С. Цветом в начале 1900-х [12];
- повторное открытие хроматографии в начале 1930-х [13];
- создание А.Дж.П. Мартином распределительной и бумажной хроматографии в начале 1940-х [14];
- разработка аминокислотного анализатора С. Муром и У.С. Штайном к концу 1950-х [15];
- разработка гель-проникающей хроматографии компанией Waters в начале 1960-х [16].

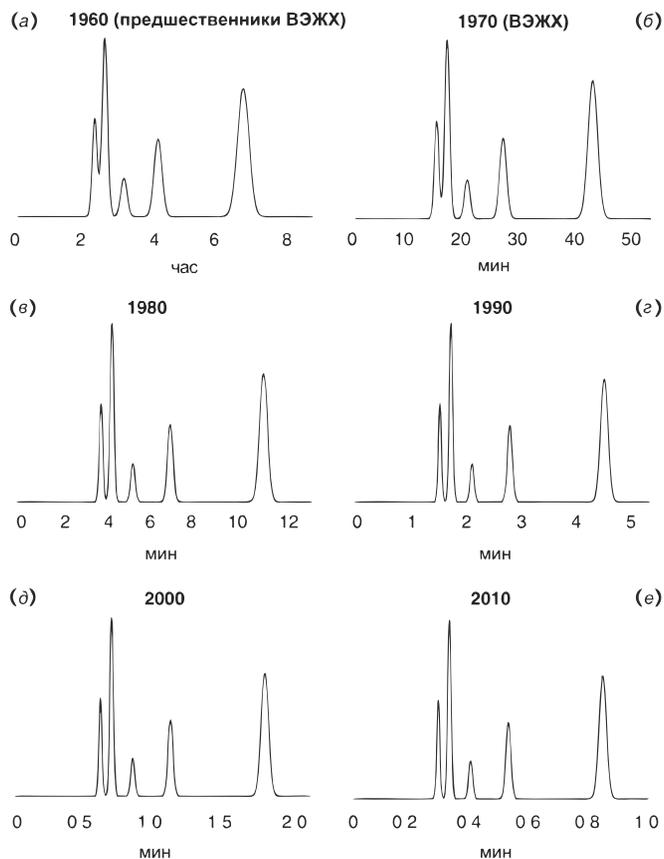
Карл Рунге, немецкий химик, занимавшийся красителями, родился в 1856 году. Он первым сообщил о разделении неочищенных красителей методом, похожим на бумажную хроматографию [10], однако ни он, ни другие исследователи не стали развивать практические возможности этой работы. В конце 1890-х годов Дэвид Дэй из Геологической Службы США разделял нефть методом, напоминающим классическую колоночную хроматографию [11]. Однако целью этой работы была не разработка методики разделения, а демонстрация того, что различное качество нефти из разных месторождений обусловлено ее разделением при прохождении сквозь слои земли. Исследования Дэвида Дэя, также как и труды Карла Рунге, не были продолжены. В начале 1900-х Михаил Цвет изобрел классическую колоночную хроматографию и продемонстрировал разделение экстрактов различных растений [12]. Это событие, безусловно, считается началом хроматографии, хотя в последующие два десятилетия эту работу по достоинству так и не оценили. В начале 1930-х годов на работу Цвета вновь обратили внимание [13], что привело к последующему бурному развитию хроматографии. В 1943 году А.Дж.П. Мартин разработал бумажную хроматографию [14], наряду с этим с конца 1930-х до середины 1950-х была введена в практику тонкослойная хроматография [17]. Такое краткое извлечение из истории, охватывающее период до 1955 года, неизбежно влечет за собой потерю огромного количества работ других исследователей, которые также внесли свой вклад в развитие хроматографии.

В конце 1950-х [15] годов был создан аминокислотный анализатор — основной предшественник ВЭЖХ. Смеси аминокислот на нем анализировали методом ионообменной хроматографии в автоматическом режиме (раздел 7.5). За этим событием последовала разработка Муром [18] гель-проникающей хроматографии (раздел 13.8), а в начале 1960-х компания Waters [16] использовала ее на практике. Каждый из этих методов был по своим принципам близок к тому, что позже стали называть ВЭЖХ, и немногим отличался от схемы, изображенной на рис. 1.1ж,з. В каждом из этих случаев через многообразную наполненную мелкозернистым сорбентом колонку насос под высоким давлением прокачивал растворитель, который после выхода из колонки направлялся в детектор. Итогом разделения была хроматограмма (рис. 1.1з). Чего же не хватало двум этим системам? Возможности разделять и анализировать разного рода образцы. Аминокислотный анализатор ограничивался лишь анализом аминокислотных смесей, а гель-проникающая хроматография служила исключительно для определения распределения молекулярной массы синтетических полимеров. Ни один из этих методов не был адаптирован для других образцов.

В начале 1960-х две группы, одна в США под руководством Чаба Хорвата, другая — в Европе под руководством Йозефа Хубера, приступили к разработке ВЭЖХ-системы универсального назначения. Оба ученых описали свои ранние рабо-

ты в личных воспоминаниях [19], а Эттре предоставил дополнительную информацию о начале работы в лаборатории Хорвата [20]. Непосредственные работы этих групп, а также связанные с ними работы других исследователей, проведенные несколькими годами позже, описаны в статьях за период с 1966 по 1968 годы [2, 21–24]. Серийное оборудование для ВЭЖХ появилось в конце 1960-х. Изначально монополистами на рынке были компании Waters Associates и DuPont. Вскоре и другие фирмы смогли предложить конкурентоспособные хроматографические системы. Началось стремительное развитие ВЭЖХ (см. рис. 1.2а). В 1971 году появилась первая книга о ВЭЖХ [25], а Американское Химическое Сообщество представило краткий курс лекций (Современная жидкостная хроматография), авторами которого были Дж.Дж. Киркленд и Л.Р. Снайдер.

Прогресс в ВЭЖХ-разделениях показан на рис. 1.5а-е, на котором видно, что продолжительность анализа за 50 лет, начиная с 1960 г., сократилась на несколько порядков. На рис. 1.5ж видно, что сокращение времени разделения (О, —) связано



**Рис. 1.5.** Хроматограммы, демонстрирующие как увеличилась эффективность ВЭЖХ с 1960 по 2010 гг. Образец: смесь пяти гербицидов. Условия: подвижная фаза 50% метанол/вода, температура комнатная. Хроматограммы а-е созданы с помощью компьютерного моделирования с использованием программы DryLab® (Раздел 10.2) на основе данных [26], диаграммы ж и з содержат дополнительную информацию об экспериментах а-е. Колонки диаметром 4,6 мм, заполнены сорбентом с одинаковой селективностью

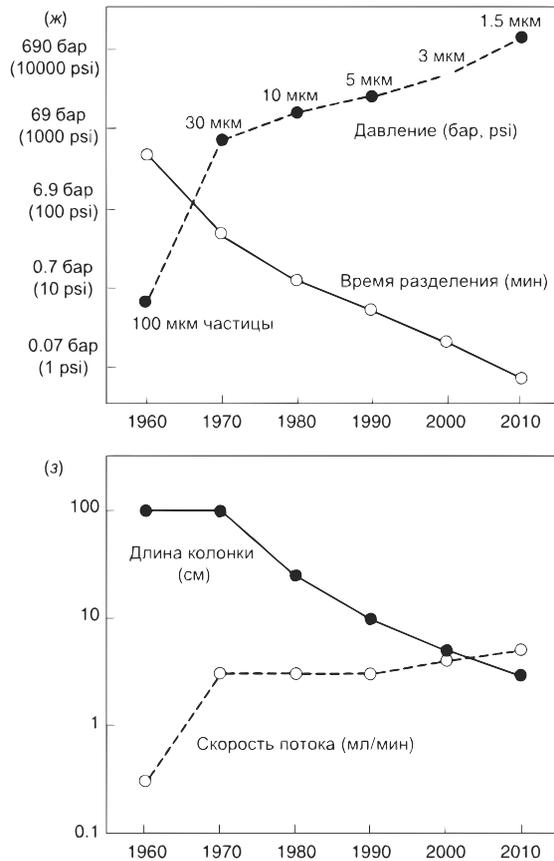


Рис. 1.5. (Окончание)

с увеличением перепада давления в колонке (---) и уменьшением размера частиц сорбента (●). Поэтому на ранних этапах развития ВЭЖХ этот метод иногда называли «жидкостная хроматография высокого давления» или «высокоскоростная жидкостная хроматография». На рис. 1.5з показаны соответствующие изменения длины колонки (●) и скорости потока (○) для этих экспериментов (рис. 1.5а-е).

Еще задолго до 1960-х годов были разработаны теоретические принципы будущего развития ВЭЖХ. В 1941 г. Мартин сообщал [27]: «самые эффективные колонки ... должны быть заполнены частицами небольшого размера и работать при больших перепадах давления». Так, в двух словах, можно сформулировать суть ВЭЖХ (как показано на рис. 1.5ж). В начале 1950-х Мартин создал смежный метод — газовую хроматографию [28]. Очень быстро этот метод стал популярен во всем мире [29], что привело к ряду теоретических исследований, которые потом будут иметь отношение к развитию ВЭЖХ. В начале 1960-х Гиддингз обобщил и продолжил эту работу уже для определенных областей применения ВЭЖХ [30]. В будущем его работа оказалась очень важна как для определения конструкции колонок, так и для выбора подходящих экспериментальных условий.

Более подробно история ранних этапов развития ВЭЖХ описана в работах [19, 31—33]. Дополнительные исторические детали, касающиеся периода после 1980 года, можно найти в собрании биографий некоторых разработчиков ВЭЖХ [34].

### 1.3. Некоторые альтернативы ВЭЖХ

Газовая хроматография (ГХ) и тонкослойная хроматография (ТСХ) — два основных метода, существовавшие еще до 1965 года, каждая из которых в определенных ситуациях может быть использована вместо ВЭЖХ. Еще один метод, разработанный до 1965 года, называется противоточной хроматографией (ПТХ). В принципе, он может составить конкуренцию ВЭЖХ в решении многих задач, но в скорости и производительности с ВЭЖХ он не сравнится. После создания ВЭЖХ были разработаны некоторые дополнительные, потенциально конкурентоспособные методы разделения: сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) в 1970-х, капиллярный электрофорез (КЭ) в 1980-х, капиллярная электрохроматография (КЭХ) в 1990-х.

#### 1.3.1. Газовая хроматография (ГХ)

Методом ГХ [35] можно проанализировать только те образцы, которые будут находиться в газовой фазе<sup>1</sup> при температурах ниже 300 °С. То есть вещества, кипящие при очень высоких температурах или вообще нелетучие, а это примерно 75% всех известных соединений, невозможно разделить с помощью ГХ. С другой стороны, ГХ отличается большей эффективностью (большим числом теоретических тарелок), а это значит, что разделение проходит быстрее и/или лучше. Поэтому ГХ предпочтительнее ВЭЖХ при анализе газов, большинства низкокипящих веществ и множества образцов, кипящих при высоких температурах, но при этом термически стабильных в условиях разделения. Кроме того, в арсенале ГХ имеются достаточно чувствительные детекторы и/или специфические детекторы селективные к конкретным элементам, благодаря чему можно существенно снизить пределы обнаружения.

#### 1.3.2. Тонкослойная хроматография (ТСХ)

К преимуществу ТСХ [36] относится возможность одновременно на одной пластинке разделять несколько проб, причем каждый компонент пробы в конце разделения виден на пластинке (в ВЭЖХ сильно удерживаемые вещества могут вообще не элюироваться с колонки и отсутствовать на хроматограмме). При использовании специального оборудования, способного под давлением направлять поток растворителя от одного края пластины к другому, стала возможна так называемая высокоэффективная ТСХ (ВЭ-ТСХ). Вне зависимости от того, как осуществляется ТСХ, по эффективности (числу теоретических тарелок) разделения она, тем не менее, проигрывает ВЭЖХ, да и количественный анализ в таких условиях менее удобен и точен. ТСХ к 2010 г в США при количественных анализах использовали довольно редко, хотя для полуколичественного анализа и определения примесей в образце этот метод очень удобен. ТСХ широко используется для скрининга большого количества образцов без необходимости существенной их очистки (например, контроль лекарственного препарата в плазме). ВЭ-ТСХ более популярна в Европе, чем в США, но гораздо менее, чем ВЭЖХ.

#### 1.3.3. Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ)

Оборудование и колонки для СФХ [37] похожи на использующиеся в ВЭЖХ. Растворителем, по определению, является сверхкритическая жидкость, обычно это углекислый газ при повышенном давлении и температуре. СФХ можно рассматривать, как расширение возможностей ГХ вследствие способности сверхкритической жидкости

<sup>1</sup> Будет находиться в значительной степени. — *Прим. перев.*

растворять и разделять нелетучие в обычных условиях соединения. То есть, СФХ занимает промежуточное положение между ГХ и ВЭЖХ и характеризуется большей эффективностью разделения (больше  $N$ ) по сравнению с ВЭЖХ, но меньшей в сравнении с ГХ. Растворитель для СФХ имеет большее значение, чем в ГХ, но меньшее, чем в ВЭЖХ. Чувствительность обнаружения в СФХ тоже находится между ВЭЖХ и ГХ. СФХ в основном используют для анализа природных и синтетических полимерных смесей, например, для разделения полифенолов [38]. Если в некоторых случаях ВЭЖХ не позволяет разделить полимеры свыше некоторого максимума молекулярной массы, то СФХ обычно значительно поднимает верхнюю границу предела молекулярной массы. Кроме того, с помощью СФХ разделяют энантиомеры, у которых близки времена удерживания, и поэтому требуется большая эффективность разделения (больше  $N$ ).

#### 1.3.4. Капиллярный электрофорез (КЭ)

КЭ [1, 39] не является одним из видов хроматографии, но в эффективности разделения определенных классов соединений может составить конкуренцию ВЭЖХ. Принцип разделения заключается в разной скорости миграции веществ внутри капилляра. Под воздействием электрического поля молекулы разделяются в зависимости от отношения массы к заряду ( $m/z$ ). Соединения с небольшим соотношением  $m/z$  мигрируют быстрее. Следовательно, с помощью КЭ можно разделять только заряженные молекулы. По сравнению с ВЭЖХ у КЭ эффективность разделения выше (больше  $N$ ), особенно при разделении соединений с большой молекулярной массой. Однако чувствительность обнаружения в случае КЭ обычно хуже, чем в ВЭЖХ. КЭ широко применяется для анализа геномных образцов, основанного на фракционировании ДНК-фрагментов. Кроме того, КЭ активно используют для разделения энантиомеров, где его эффективность может быть выше ВЭЖХ по двум причинам: во-первых, такие разделения, как правило, трудны, и для них требуется большее значение  $N$ , что может обеспечить КЭ; во-вторых, ВЭЖХ разделения обычно проводят на *хиральных колонках*. Прежде чем получить удовлетворительный результат, каждый конкретный образец разделяют методом проб и ошибок на нескольких разных (и дорогостоящих) колонках, в то время как для КЭ достаточно всего лишь небольшого количества разных хиральных селекторов. В отличие от ВЭЖХ разделение происходит быстрее, стоит дешевле, а метод является более универсальным. Дорогие хиральные комплексобразующие реагенты нецелесообразно использовать в ВЭЖХ, поскольку скорости потока в обычной ВЭЖХ много больше, чем в КЭ (мл/мин против мкл/мин). Кроме того, существуют несколько вариантов КЭ, расширяющих использование этого метода для других типов образцов. К примеру, с помощью мицеллярной электрокинетической хроматографии можно разделять неионные соединения [40].

#### 1.3.5. Противоточная хроматография (ПТХ)

ПТХ [41, 42] представляет собой более ранний вид жидкостно-жидкостной распределительной хроматографии, впоследствии улучшенной различными способами. ВЭЖХ с жидкой неподвижной фазой была вытеснена ВЭЖХ с привитыми фазами, и потому ПТХ в качестве альтернативы ВЭЖХ стали использовать все реже. Часто упоминаемая особенность ПТХ — отсутствие проблем, вызванных необратимой сорбцией образца на обширной внутренней поверхности колонок в ВЭЖХ. Однако используемые в настоящее время колонки для ВЭЖХ лишены этого недостатка. У ПТХ есть некоторые преимущества при препаративном разделении энантиомеров [43]. В остальных случаях эта методика используется главным образом для выделения лабильных природных соединений.

### 1.3.6. Специальные виды ВЭЖХ

В разделах 1.3.1—1.3.5 описаны пять методов разделения, существенно отличающихся от ВЭЖХ. Еще четыре, о которых в данной книге речь не пойдет, можно отнести к разновидностям ВЭЖХ. Тем не менее большая часть используемой в следующих главах информации может быть применена и для них.

*Капиллярная электрохроматография* [44, 45] (КЭХ), в основном, подобна ВЭЖХ за исключением одного момента: растворитель проходит через колонку не с помощью нагнетающего его насоса, а посредством создания электрического потенциала на концах колонки (эндоосмотический поток). Поскольку поток растворителя никак не зависит от размера частиц сорбента (а эффективность колонки может быть выше при малом размере частиц), то, в принципе, с помощью КЭХ можно получить гораздо большие значения  $N$ , чем с помощью обычной ВЭЖХ. Кроме того,  $N$  также увеличивается благодаря собственно эндоосмотическому потоку. Имея в виду потенциально большие значения  $N$  в КЭХ по сравнению с ВЭЖХ, с 1995 года в практическую реализацию этого метода инвестировались значительные средства, однако к моменту выхода из печати этой книги оставались нерешенными важные технические проблемы, не позволяющие КЭХ стать рутинной альтернативой ВЭЖХ.

*ВЭЖХ на чипе* [46] — недавно разработанная технология для удобного анализа небольших количеств образца. Микроколонку (например,  $43 \times 0,06$  мм), которая является частью чипа, устанавливают между микронасосом и масс-спектрометром. Принцип разделения такой же, как и в ВЭЖХ с обычными колонками и оборудованием. К преимуществам можно отнести эффективность разделения и удобство при разделении очень малых количеств образца.

*Ионная хроматография* [47, 48] — широко используемая методика анализа смесей, содержащих неорганические анионы и катионы, например,  $\text{Cl}^-$  и  $\text{Na}^+$  соответственно. Хотя принципы разделения такие же, как и в ионообменной ВЭЖХ (раздел 7.5), для ионной хроматографии требуется особое оборудование. Эта методика, главным образом, предназначена для анализа неорганических соединений.

*Мицеллярная жидкостная хроматография* — вариант обращенно-фазовой хроматографии, только вместо водно-органических элюентов используют водный раствор поверхностно активного вещества [49]. В настоящее время эта методика очень редко применяется из-за низкой эффективности разделения.

## 1.4. Другие источники информации о ВЭЖХ

В дополнение к данной книге имеется огромное количество других доступных источников информации. К ним относятся различные публикации (раздел 1.4.1-1.4.3), краткие курсы (раздел 1.4.4) и интернет (раздел 1.4.5).

### 1.4.1. Книги

К настоящему времени изданы сотни книг, которые легко можно найти в интернете на сайте Amazon.com и других сайтах. Книги по ВЭЖХ можно разделить на 2 группы:

1. специализированные книги, посвященные ВЭЖХ разделением образцов определенного типа (например, белков, углеводов, энантиомеров и др.) или особенностям детектирования (например, масс-спектрометрии, химической дериватизации);
2. общие книги, такие как эта книга, охватывающие все аспекты ВЭЖХ.

Далее в конце глав перечислены профильные книги по разным тематикам ВЭЖХ. В таблице 1.1 приведен неполный список книг по общим темам ВЭЖХ, опубликованных с 1995 года. Они могут оказаться полезным дополнением к настоящей книге.

Таблица 1.1. Список наиболее интересных книг по общей ВЭЖХ, опубликованных с 1995 года

Название	Автор(ы)	Дата печати	Издательство
<b>Общая ВЭЖХ</b>			
<i>Handbook of HPLC</i>	E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, and N. Miller, eds.	1998	Dekker
<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	S. Lindsay	2000	Wiley
<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	E. Prichard	2003	Royal Society of Chemistry
<i>HPLC</i> , 2nd ed.	M. C. McMaster	2006	Wiley-Interscience
<i>Modern HPLC for Practicing Scientists</i>	M. W. Dong	2006	Wiley-Interscience
<i>Practical High-Performance Liquid Chromatography</i> , 4th ed.	V. R. Meyer	2006	Wiley-Interscience
<b>Разработка методик</b>			
<i>Practical HPLC Method Development</i> , 2nd ed.	L. R. Snyder, J. L. Glajch, and J. J. Kirkland	1997	Wiley-Interscience
<i>HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization</i>	S. Kromidas	2006	Wiley
<b>Устранение неисправностей</b>			
<i>LC Troubleshooting</i>	J. W. Dolan	С 1983 г. по настоящее время	Ежемесячная колонка в журнале LCGC Magazine; предыдущие статьи в свободном доступе на сайте <a href="http://www.chromatographyonline.com">www.chromatographyonline.com</a>
<i>Troubleshooting HPLC Systems: A Bench Manual</i>	P. C. Sadek	1999	Wiley
<i>More Practical Problem Solving in HPLC</i>	S. Kromidas	2005	Wiley
<i>Pitfalls and Errors of HPLC in Pictures</i> 2nd ed.	V. R. Meyer	2006	Wiley
<b>Препаративная ВЭЖХ</b>			
<i>Practical Handbook of Preparative HPLC</i>	D. A. Wellings	2006	Elsevier
<b>ВЭЖХ-колонки</b>			
<i>HPLC Columns: Theory, Technology and Practice</i>	U. D. Neue	1997	Wiley-VCH
<b>ВЭЖХ-растворители</b>			
<i>The HPLC Solvent Guide</i>	P. C. Sadek	1996	Wiley
<b>Градиентное элюирование</b>			
<i>High-Performance Gradient Elution</i>	L. R. Snyder and J. W. Dolan	2007	Wiley

### 1.4.2. Журналы

Технические статьи по ВЭЖХ можно найти в большинстве химических и биохимических журналов. Тем не менее, приведенный ниже список журналов будет особенно ценен для тех читателей, которые хотят быть в курсе новых разработок в этой области.

- *Analytical Chemistry*, American Chemical Society
- *Chromatographia*, Springer
- *Journal of Chromatographic Science*, Preston
- *Journal of Chromatography A*, Elsevier
- *Journal of Chromatography B*, Elsevier
- *Journal of Liquid Chromatography*, Wiley
- *Journal of Separation Science*, Wiley
- *LCGC*, Advanstar (separate issues for North America and Europe)

### 1.4.3. Обзоры

Обзоры по ВЭЖХ можно найти не только в тех журналах, которые перечислены выше, но и в других. Кроме того, есть ряд публикаций, частично посвященных ВЭЖХ, изданных или в виде сборников обзорных статей

- *Advances in Chromatography*, Dekker
- *High-Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives*, Academic Press (публиковались только с 1980 г. по 1986 г.)

или как отдельные книги:

- *Journal of Chromatography Library*, Elsevier

### 1.4.4. Краткие курсы

В настоящее время существует огромное количество кратких курсов, которые читаются как вживую, так и через интернет (раздел 1.4.5). Актуальный список кратких курсов можно найти на последней странице журнала *LCGC*, либо в интернете по запросу «ВЭЖХ тренинг».

### 1.4.5. Интернет

Динамичное развитие интернета гарантирует нам быстрое устаревание напечатанной в книге информации. Нижеперечисленные сайты содержат ссылки на другие сайты и, вполне очевидно, будут таким образом постоянно обновляться:

- <http://www.lcresources.com>
- <http://matematicas.udea.edu.co/carlopez/index7.html>
- <http://lchromatography.com/hplcfind/index.html>
- <http://tech.groups.yahoo.com/group/chrom-L/links>
- <http://userpages.umbc.edu/dfrey1/Freylink>
- [http://www.infochembio.ethz.ch/links/en/analytchem\\_chromat.html](http://www.infochembio.ethz.ch/links/en/analytchem_chromat.html)
- <http://www.chromatographyonline.com>

## Литература

1. R. L. Cunico, K. M. Gooding, and T. Wehr, *Basic HPLC and CE of Biomolecules*, Bay Bioanalytical Laboratory, Richmond, CA, 1998, p. 4.
2. C. G. Horváth and S. R. Lipsky, *Nature*, 211 (1966) 748.

3. I. Halasz, R. Endeke, and J. Asshauer, *J. Chromatogr.*, 112 (1975) 37.
4. I. Molnar and C. Horváth, *J. Chromatogr. (Biomed App.)*, 143 (1977) 391.
5. T. Issaeva, A. Kourganov, and K. Unger, *J. Chromatogr. A*, 846 (1999) 13.
6. K. Wagner, T. Miliotis, G. Marko-Varga, R. Biscoff, and K. Unger, *Anal. Chem.*, 74(2002) 809.
7. S. H. Chang, K. M. Gooding, and F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 103.
8. W. W. Hancock, C. A. Bishop, and M. T. W. Hearn, *Science*, 153 (1978) 1168.
9. W. H. Pirkle, D. W. House, and J. M. Finn, *J. Chromatogr.*, 192 (1980) 143.
10. H. H. Bussemas and L. S. Ettre, *LCGC*, 22 (2004) 262.
11. L. S. Ettre, *LCGC*, 23 (2005) 1274.
12. L. S. Ettre, *LCGC*, 21 (2003) 458.
13. L. S. Ettre, *LCGC*, 25 (2007) 640.
14. L. S. Ettre, *LCGC*, 19 (2001) 506.
15. L. S. Ettre, *LCGC*, 243 (2006) 390.
16. L. S. Ettre, *LCGC*, 23 (2005) 752.
17. J. G. Kirchner, *Thin-layer Chromatography*, Wiley-Interscience, New York, 1978, pp. 5–8.
18. J. C. Moore, *J. Polymer Sci. Part A*, 2 (1964) 835.
19. L. S. Ettre and A. Zlatkis, eds., *75 years of Chromatography—A Historical Dialog*, Elsevier, Amsterdam, 1979.
20. L. S. Ettre, *LCGC*, 23 (2005) 486.
21. J. F. K. Huber and J. A. R. Hulsman, *J. Anal. Chim. Acta*, 38 (1967) 305.
22. J. J. Kirkland, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 218.
23. L. R. Snyder, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 698, 705.
24. R. P. W. Scott, W. J. Blackburn, and T. J. Wilkens, *J. Gas Chrommatogr.*, 5 (1967) 183.
25. J. J. Kirkland, ed., *Modern Practice of Liquid Chromatography*, Wiley-Interscience, New York, 1971.
26. T. Braumann, G. Weber, and L. H. Grimme, *J. Chromatogr.*, 261 (1983) 329.
27. A. J. P. Martin and R. L. M. Synge, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1358.
28. A. T. James and A. J. P. Martin, *Biochem. J.*, 50 (1952) 679.
29. L. S. Ettre, *LCGC*, 19 (2001) 120.
30. J. C. Giddings, *Dynamics of Chromatography. Principles and Theory*, Dekker, NewYork, 1965.
31. L. R. Snyder, *J. Chem. Ed.*, 74 (1997) 37.
32. L. S. Ettre, *LCGC Europe*, 1 (2001) 314.
33. L. R. Snyder, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 412A.
34. C. W. Gehrke, ed., *Chromatography—A Century of Discovery 1900–2000*, Elsevier, Amsterdam, 2001.
35. R. L. Grob and E. F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4th ed., Wiley-Interscience, NewYork, 2004.
36. B. Fried and J. Sherma, *Thin-Layer Chromatography (Chromatographic Science, Vol.81)*, Dekker, New York, 1999.
37. R. M. Smith and S. M. Hawthorne, eds., *Supercritical Fluids in Chromatography and Extraction*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
38. T. Bamba, E. Fukusaki, Y. Nakazawa, H. Sato, K. Ute, T. Kitayama, and A. Kobayashi, *J. Chromatogr. A*, 995 (2003) 203.
39. K. D. Altria and D. Elder, *J. Chromatogr. A*, 1023 (2004) 1.
40. A. Berthod and C. García-Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Dekker, New York, 2000.
41. Y. Ito and W. D. Conway, eds., *High-Speed Countercurrent Chromatography*, Wiley, New York, 1996.
42. J.-M. Menet and D. Thiebaut, eds., *Countercurrent Chromatography*, Dekker, NewYork, 1999.
43. E. Gavioli, N.M.Maier, C.Minguillón, and W. Lindner, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5837.
44. K. D. Bartle and P. Meyers, *Capillary Electrochromatography (Chromatography Monographs)*, 2001.
45. F. Svec, ed., *J. Chromatogr. A*, 1044 (2004).
46. H. Yin and K. Killen, *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 1427.
47. J. S. Fritz and D. T. Gjerde, *Ion Chromatography*, 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
48. J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*, 3rd ed., Wiley, 2005.
49. A. Berthod and M. C. García-Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Dekker, New York, 2000.

## ГЛАВА 2

# ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ И УПРАВЛЕНИЕ РАЗДЕЛЕНИЕМ

2.1. Введение . . . . .	57
2.2. Хроматографический процесс . . . . .	57
2.3. Удерживание . . . . .	61
2.3.1. Фактор удерживания $k$ и мертвое время колонки $t_0$ . . . . .	61
2.3.2. Роль условий разделения и состава образца . . . . .	65
2.3.2.1. Межмолекулярные взаимодействия . . . . .	67
2.3.2.2. Температура . . . . .	71
2.4. Ширина пика и число теоретических тарелок колонки $N$ . . . . .	71
2.4.1. Зависимость $N$ от условий разделения . . . . .	73
2.4.1.1. Процессы размывания пика, определяющие значения $N$ . . . . .	76
2.4.1.2. Несколько рекомендаций по выбору колонки . . . . .	82
2.4.2. Форма пика . . . . .	86
2.5. Разрешение и разработка метода . . . . .	89
2.5.1. Оптимизация фактора удерживания $k$ (член $a$ в уравнении (2.24)) . . . . .	93
2.5.2. Оптимизация селективности $\alpha$ (член $b$ в уравнении (2.24)) . . . . .	95
2.5.2.1. «Правильные» и «неправильные» образцы . . . . .	96
2.5.3. Оптимизация числа теоретических тарелок $N$ (член $v$ в уравнении (2.24)) . . . . .	97
2.5.3.1. Зависимость результатов разделения от параметров колонки . . . . .	97
2.5.3.2. Скоростная ВЭЖХ . . . . .	99
2.5.4. Разработка метода . . . . .	101
2.5.4.1. Оценка состава образца и целей разделения . . . . .	101
2.5.4.2. Пробоподготовка . . . . .	102
2.5.4.3. Выбор вида хроматографии . . . . .	102
2.5.4.4. Выбор детектора . . . . .	102
2.5.4.5. Выбор хроматографических условий . . . . .	102
2.5.4.6. Спрогнозировать, определить и решить возможные проблемы . . . . .	103
2.5.4.7. Валидация метода и пригодность системы . . . . .	104
2.6. Влияние количества пробы . . . . .	105
2.6.1. Перегрузка по объему: влияние объема образца на разделение . . . . .	105
2.6.2. Перегрузка по массе: влияние массы образца на разделение . . . . .	107
2.6.3. Как избежать проблем, связанных со слишком большим количеством образца . . . . .	108
2.6.3.1. Если концентрация образца больше ожидаемой . . . . .	109
2.6.3.2. Анализ следовых количеств вещества . . . . .	109
2.7. Смежные темы . . . . .	110
2.7.1. Уравновешивание колонки . . . . .	110
2.7.2. Градиентное элюирование . . . . .	110
2.7.3. Пиковая емкость и двумерное разделение . . . . .	4
2.7.4. Отслеживание пика . . . . .	112
2.7.5. Вторичные равновесия . . . . .	114
2.7.6. Переключение колонок . . . . .	115
2.7.7. Предварительная оценка удерживания по структуре анализируемого вещества . . . . .	116
2.7.7.1. Модель сольватационных параметров . . . . .	118
Литература . . . . .	119

## 2.1. Введение

Без понимания того, как разделение зависит от экспериментальных условий (колонка, растворитель, температура, скорость потока и т.д.) оно успешным не будет. В этой главе будут рассмотрены некоторые общие аспекты ВЭЖХ, которые помогут разработать приемлемое разделение (разработка метода), выполнять рутинные ВЭЖХ-анализы образцов и преодолевать трудности по мере их возникновения. Как правило, описательный или качественный подход лучше всего позволяет понять процесс разработки метода и использование ВЭЖХ в рутинных целях. Поэтому *читатель может пролистать или пропустить любые из последующих выводов формул, по крайней мере при ознакомлении с текстом*. Важные уравнения, необходимые в работе, помещены в рамочку, например, уравнение (2.5).

## 2.2. Хроматографический процесс

На рис. 2.1 схематически изображена ВЭЖХ-система. Сплошными стрелками указано направление потока: из емкости с растворителем к детектору. Растворитель обычно называют *элюентом* или *подвижной фазой*. В главе 3 более подробно описан каждый узел ВЭЖХ-системы. После того, как образец из инжектора попадает в колонку, происходит разделение. Разделенные компоненты образца покидают колонку (*элюируются* или *вымываются* из нее) и с потоком подвижной фазы направляются в детектор, в большинстве случаев ультрафиолетовый (УФ) или масс-спектрометрический (МС). В главе 4 подробно рассказано о каждом виде ВЭЖХ-детекторов. Основные свойства или «режим» разделения определяются, главным образом, выбором колонки (табл. 2.1). В настоящее время для анализа образцов преимущественно используют обращенно-фазовую хроматографию (ОФХ), для которой характерно использование неполярной неподвижной фазы (колонки) совместно с полярной подвижной фазой (смесь воды и органического растворителя). В этой книге, если не оговорено иное, в основном, рассматриваются разделения в режиме ОФХ. Другие режимы ВЭЖХ можно найти в нижеследующих разделах этой книги (табл. 2.1). В главах 2—8 мы будем считать состав растворителей на протяжении всего разделения постоянным, что характерно для *изократического элюирования*. В случае *градиентного элюирования* соотношение элюентов во время разделения сознательно изменяют (раздел 2.7.2, глава 9).

Колонка представляет собой цилиндрическую трубку, наполненную чаще всего небольшими (как правило, диаметром от 1,5 до 5 мкм) сферическими частицами

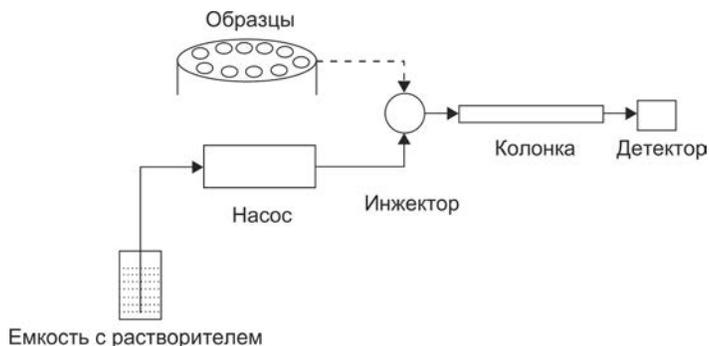
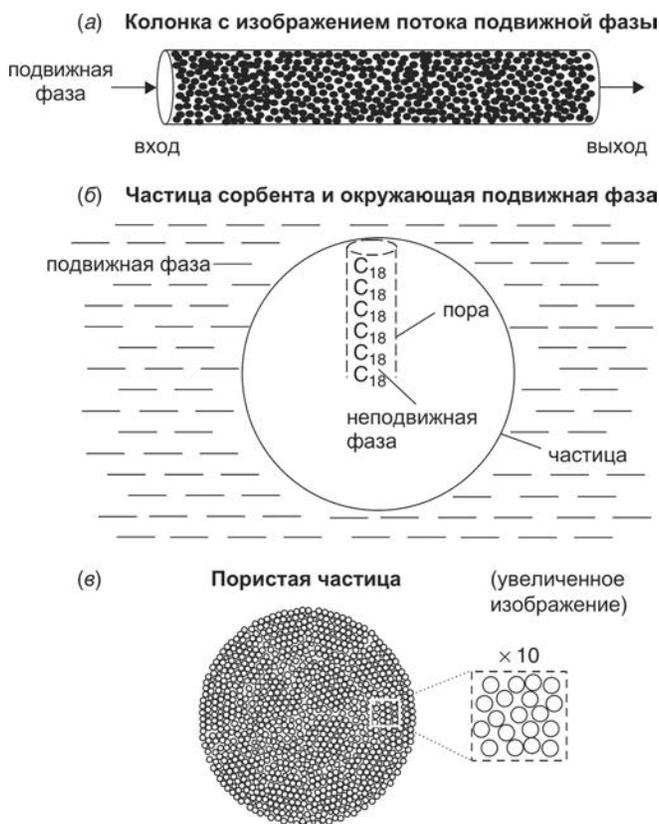


Рис. 2.1. Схематическое изображение ВЭЖХ-системы.

Таблица 2.1. Режимы ВЭЖХ-разделений

Хроматографический режим	Комментарии	Глава, в которой можно найти подробное описание
Обращенно-фазовая хроматография (ОФХ)	Неполярная колонка (например, $C_{18}$ ), полярная подвижная фаза — смесь воды и органического растворителя (например, ацетонитрила). ОФХ очень популярна, особенно для образцов, растворимых в воде	Глава 6, раздел 7.3
Нормально-фазовая хроматография (НФХ)	Полярная колонка (например, непривитый силикагель), неполярная подвижная фаза — смесь неполярных и слабо полярных растворителей (например, гексана и хлористого метилена). НФХ подходит для анализа нерастворимых в воде образцов, препаративной ВЭЖХ и разделения изомеров	Глава 8
Неводная обращенно-фазовая хроматография (НОФХ)	Неполярная колонка (например, $C_{18}$ ), подвижная фаза — смесь органических растворителей (например, ацетонитрила и хлористого метилена). С помощью НОФХ разделяют очень гидрофобные, нерастворимые в воде образцы	Раздел 6.5
Хроматография гидрофильных взаимодействий (ГИХ)	Полярная колонка (например, силикагель или силикагель с привитой амидной фазой), подвижная фаза — смесь воды и органического растворителя (например, ацетонитрила). ГИХ используют для сильнополярных и поэтому слабоудерживаемых в ОФХ образцов	Раздел 8.6
Ионообменная хроматография (ИОХ)	Колонка содержит заряженные группы, которые могут взаимодействовать с противоположно заряженными ионами образца, подвижная фаза — смесь водного раствора соли и буфера. В режиме ИОХ разделяют ионизированные молекулы, такие, как кислоты и основания. Особенно этот режим подходит для разделения крупных биомолекул (например, белков и нуклеиновых кислот)	Разделы 7.3, 13.4.2
Ион-парная хроматография (ИПХ)	Используют условия ОФХ, но в подвижную фазу дополнительно добавляют ион-парный агент для взаимодействия с противоположно заряженными ионами образца. С помощью ИПХ разделяют кислоты или основания, слабо удерживаемые в ОФХ	Раздел 7.4
Эксклюзионная хроматография (ЭХ)	Используют нейтральную колонку с водной или органической подвижной фазой. Принцип ЭХ — разделение веществ по молекулярной массе, поэтому в этом режиме главным образом разделяют крупные биомолекулы или синтетические полимеры	Раздел 13.8

(рис. 2.2а). Основой частицы в большинстве случаев является пористый силикагель. На рис. 2.2 изображена пора в виде цилиндра определенного диаметра (обычно около 10 нм для «небольших молекул» массой менее 1000 Да). Внутренняя поверхность каждой поры покрыта *неподвижной фазой*, в этом примере группами  $C_{18}$ , привитыми к частице силикагеля. На рис. 2.2в можно видеть приближенное к реальности изображение современных пористых частиц для ВЭЖХ. Частицы, как показано на рисунке, формируются из небольших сферических субчастиц. Поры представляют собой пространство между субчастицами. Поскольку практически вся поверхность частицы находится внутри этих пор, то большинство молекул образца удерживаются *внутри* частицы, а не на ее поверхности. На внутреннюю поверхность пор приходится более 99% всей площади поверхности частиц, поэтому влияние внешней поверхности частицы на разделение в большинстве случаев ничтожно мало. Подвижная фаза,

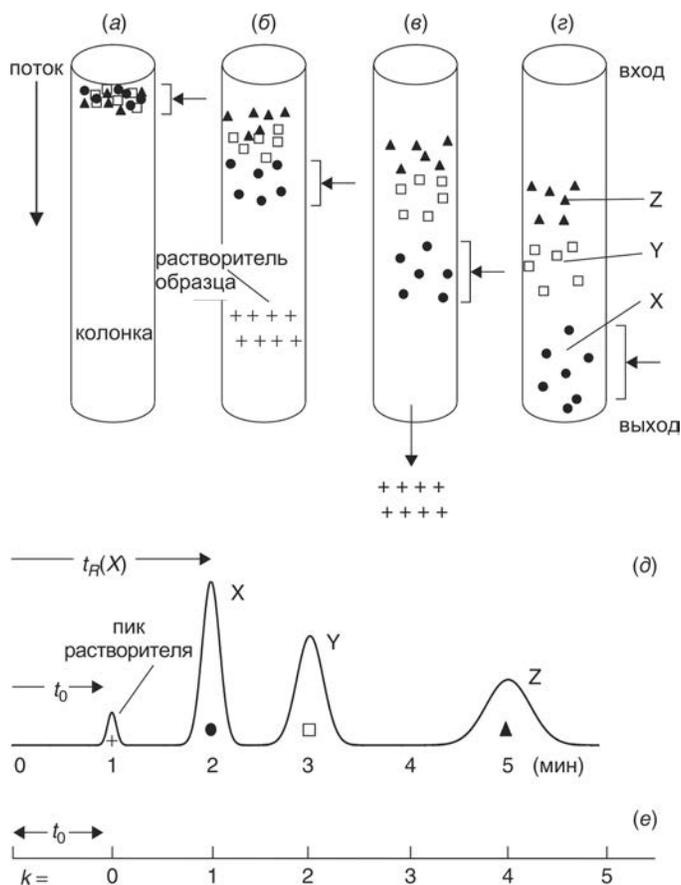


**Рис. 2.2.** ВЭЖХ-колонка. (а) Колонка упакована сферическими частицами; (б) схематическое изображение частицы, демонстрирующее идеальную пору с привитыми  $C_{18}$ -группами; (в) более реалистичное изображение сферической пористой частицы (10-кратное увеличение)

перемещаясь внутри колонки, обволакивает каждую частицу, и благодаря диффузии молекулы образца проникают в поры частиц. Обычно поток практически никогда не течет *сквозь* частицу.

На рис. 2.3 изображено гипотетическое разделение образца, содержащего три соединения (или *три растворенных вещества*). Вещество  $X$  обозначено  $\bullet$ ,  $Y$  —  $\square$ ,  $Z$  —  $\blacktriangle$ . Молекулы элюента для упрощения не показаны, а молекулы растворителя, в котором растворен образец, изображены в виде  $+$ . Нанесенный на колонку образец (рис. 2.3а) под действием потока подвижной фазы перемещается по колонке (рис. 2.3б-г) и, в итоге, растворенные вещества последовательно вымываются из нее (рис. 2.3д). Детектор при этом регистрирует изменение сигнала в зависимости от времени, такую запись разделения называют *хроматограммой*. Во время разделения (рис. 2.3а-г) вещества  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$  ведут себя по-разному: различаются *скорости их перемещения* и *распределение молекул* этих веществ. К моменту, показанному на рис. 2.3г, вещества  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$  внутри колонки отделились друг от друга.

Различные скорости перемещения (разные средние скорости, с которыми вещества  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$  двигаются или перемещаются внутри колонки) являются основой хрома-



**Рис. 2.3.** ВЭЖХ-разделение. (а-г) Последовательное разделение внутри колонки (в зависимости от времени); (д) конечная хроматограмма; (е) оценка значений  $k$  по хроматограмме (д). Растворенные вещества X, Y, Z обозначены ●, □, ▲, соответственно, молекулы растворителя, в котором растворен образец, показаны +

тографического разделения. Отсутствие разницы в скорости перемещения говорит о невозможности разделения двух соединений. В этом примере быстрее всех перемещаются молекулы X (●), а медленнее всех — Z (▲). Молекулы растворителя, в котором растворен образец, как и молекулы подвижной фазы, вообще не удерживаются на колонке, проскакивают сквозь нее быстрее всех и вымываются из колонки раньше молекул образца. На рисунке молекулы растворителя образца показаны + (рис. 2.3б-д).

По мере перемещения вещества по колонке его молекулы все более существенно распределяются по ее объему. Объем, который занимают молекулы вещества внутри колонки, называют *полосой* или *зоной*. Ширина этого объема измеряется по направлению потока и называется *шириной полосы*. На рисунке 2.3а-г ширина полосы для вещества X (●) указана стрелкой и скобкой. Полоса, смытая с колонки и зарегистрированная на хроматограмме (рис. 2.3д), называется *пиком*. Распознавание пика

проводят по времени его выхода из колонки (*время удерживания*  $t_R$ )<sup>1</sup>. Концентрация растворенного вещества в образце пропорциональна размеру пика, определяемому либо по его площади, либо по его высоте (раздел 11.2.3). При достаточно малом количестве вещества, наносимом на колонку (от нескольких нанограмм до микрограмм, что характерно для количественного ВЭЖХ-анализа), время удерживания не зависит от концентрации образца (и размера получающегося пика). Далее в этой главе зависимость разделения от экспериментальных условий будет изучена подробнее.

## 2.3. Удерживание

Время удерживания вещества  $t_R$  — это промежуток времени, которое проходит с момента ввода вещества в инжектор до появления вершины пика на хроматограмме. Время удерживания веществ  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$  соответственно 2, 3 и 5 минут (рис. 2.3д). Время удерживания пика растворителя, равное одной минуте, называют *мертвым временем*  $t_0$  колонки (раздел 2.3.1) (иногда для обозначения мертвого времени колонки  $t_0$  заменяют  $t_m$ ). Степень перемещения или скорость  $u_x$ , с которой вещество  $X$  движется по колонке, определяется фракцией  $R$  молекул вещества  $X$ , находящихся в любой момент времени в подвижной фазе. В среднем  $u_x$  равна  $R$ , умноженной на скорость перемещения или скорость  $u$  молекул растворителя:

$$u_x = Ru. \quad (2.1)$$

Например, если половина молекул  $X$  находится в подвижной фазе ( $R = 0,5$ ), а вторая половина адсорбировалась на неподвижной фазе, значит, в любой момент времени только половина всех молекул перемещается с потоком и, следовательно, *средняя* скорость вещества  $X$  будет равна половине скорости движения подвижной фазы.

На рис. 2.4 показано, что фракция  $R$  молекул вещества  $X$  в подвижной (движущейся) фазе определяется равновесным процессом:

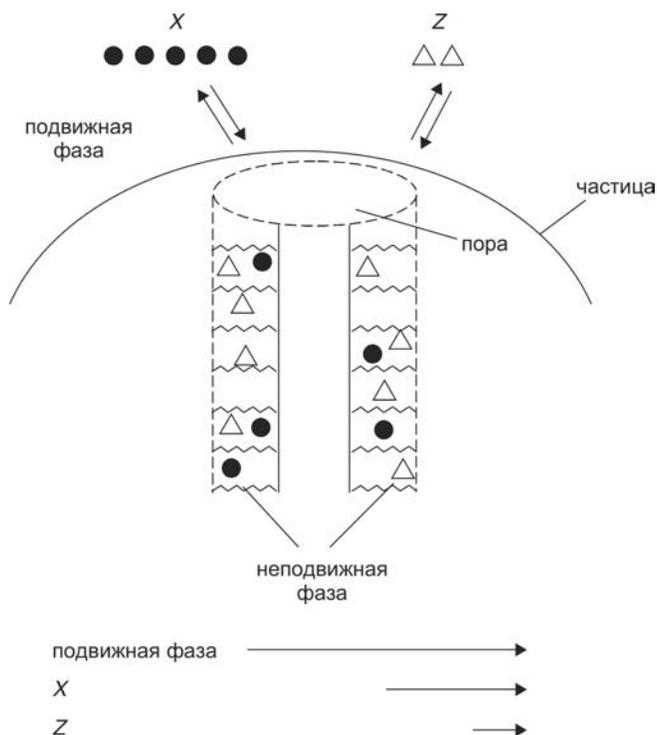


Молекулы  $X$  в любой момент времени присутствуют в равном количестве в подвижной и неподвижной фазах, в то время как молекулы вещества  $Z$  преимущественно адсорбировались на неподвижной фазе. То есть вещество  $Z$  сильнее удерживается по сравнению с веществом  $X$ , а значит, и перемещается медленнее (указано в нижней части рис. 2.4 стрелками, длина которых отражает скорость перемещения). На это равновесие и скорость перемещения вещества влияют структура молекулы, химический состав элюента и сорбента (растворителя и колонки), а также температура. Давление, изменяемое вдоль колонки, при разделении оказывает незначительное влияние на удерживание вещества [1] (см. также раздел 2.5.3.1) и, как правило, не учитывается при умеренных значениях (например, менее 345 бар/5000 psi).

### 2.3.1. Фактор удерживания $k$ и мертвое время колонки $t_0$

Для данных соединений *фактор удерживания*  $k$  (его до сих пор еще называют *коэффициентом емкости*  $k'$ ) определяют по отношению количества вещества на неподвижной фазе ( $s$ ) к его количеству в подвижной фазе ( $m$ ). Количество вещества

<sup>1</sup>Надо все же понимать, что выходит из колонки не пик, а вещество, в то время как пик есть лишь отражение этого процесса на хроматограмме. — *Прим. перев.*



**Рис. 2.4.** Равновесное распределение молекул растворителя и вещества между элюентом и сорбентом, и его влияние на скорость перемещения веществ. Значения  $k$  для веществ  $X$  и  $Z$  равны 1 и 4 соответственно. Предполагается, что в образце находится равное количество  $X$  и  $Z$ .

в каждой фазе равно его концентрации ( $C_s$  или  $C_m$  соответственно), умноженной на объем фазы ( $V_s$  или  $V_m$ , соответственно), то есть:

$$k = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = \frac{C_s / C_m}{V_s / V_m} = K\Psi, \quad (2.3)$$

где  $K = (C_s/C_m)$  — константа равновесия в уравнении (2.2), а  $\Psi = (V_s/V_m)$  — это *фазовое отношение*, то есть соотношение объемов неподвижной и подвижной фаз внутри колонки. Далее будет показано, что величина  $k$  — важная характеристика каждого пика на хроматограмме. Значения  $k$  позволяют нам интерпретировать и улучшать разделение. Молекулы анализируемого вещества должны присутствовать в обеих фазах, то есть, если фракция молекул вещества, находящаяся в элюенте, будет  $R$ , то фракция молекул вещества на сорбенте должна быть  $1-R$ . Тогда из уравнения (2.3) следует:

$$k = \frac{1-R}{R} \quad (2.3a)$$

или

$$R = \frac{1}{1+k}. \quad (2.36)$$

Время удерживания  $X$  ( $t_R$ ) можно вычислить, разделив расстояние на скорость (скорость полосы), где расстояние — это длина колонки  $L$ , а скорость полосы — это  $u_x$ :

$$t_R = \frac{L}{u_x}. \quad (2.4)$$

Аналогичным образом определяют время удерживания пика растворителя

$$t_0 = \frac{L}{u}. \quad (2.4a)$$

где  $u$  — средняя скорость подвижной фазы. Если из уравнения (2.4a) выразить величину  $L$  и подставить в уравнение (2.4), то получится:

$$t_R = \frac{t_0 u}{u_x}. \quad (2.4b)$$

Если из уравнения (2.1) выразим  $R = u_x/u_0$  и подставим в уравнение (2.3b), то получим:

$$t_R = t_0(1 + k). \quad (2.5)$$

Кроме того, уравнение (2.5) можно выразить через объем удерживания  $V_R = t_R F$ , где  $F$  — скорость подвижной фазы (мл/мин):

$$V_R = V_m(1 + k). \quad (2.5a)$$

Здесь  $V_m$  — это мертвый объем колонки, равный  $t_0 F$  (далее величина  $V_m$  и уравнение (2.5a) будут рассмотрены подробнее).

Уравнение (2.5) можно записать по-другому:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}. \quad (2.6)$$

По уравнению (2.6) можно вычислить значения  $k$  каждого пика на хроматограмме. На практике  $k$  часто оценивают визуально по хроматограмме (на основе уравнения 2.6), поскольку в рутинных анализах и при разработке разделения (*разработка метода*) редко требуются точные значения  $k$ . Таким образом,  $k$  эквивалентен разности времен удерживания ( $t_R - t_0$ ), отнесенной к  $t_0$  или:

$$k = \left( \frac{t_R}{t_0} \right) - 1. \quad (2.6a)$$

По  $t_0$  можно также примерно оценить  $k$  (рис. 2.3e, который соответствует хроматограмме на рис. 2.3d). Так для соединения  $X$   $k$  равно одному отрезку  $t_0$ , считая от  $t_0$ , для  $Y$  — двум отрезкам  $t_0$ ,  $Z$  — четырем отрезкам.

Далее в разделе 2.4.1 описано почему  $k$  предпочтительно должно находиться в интервале значений от 1 до 10. Поэтому очень важно уметь оценивать (или вычислять) значения  $k$  различных пиков на хроматограмме, что, в свою очередь, требует знания мертвого времени  $t_0$  колонки. Величину  $t_0$  обычно определяют визуально по отклонению базовой линии в самом начале хроматограммы (рис. 2.5a-б). Иногда первый всплеск базовой линии имеет характерную форму (рис. 2.5a), которая точно указывает на пик неудерживаемого растворителя образца. Такой всплеск при  $t_0$  обычно происходит при смене показателя преломления (ПП) подвижной фазы (из-за разницы ПП подвижной фазы и растворителя образца), что влияет на количество света, проходящего через ячейку детектора. Пик при  $t_0$  может отсутствовать, если образец растворяют в элюенте (лучше всего так и делать).

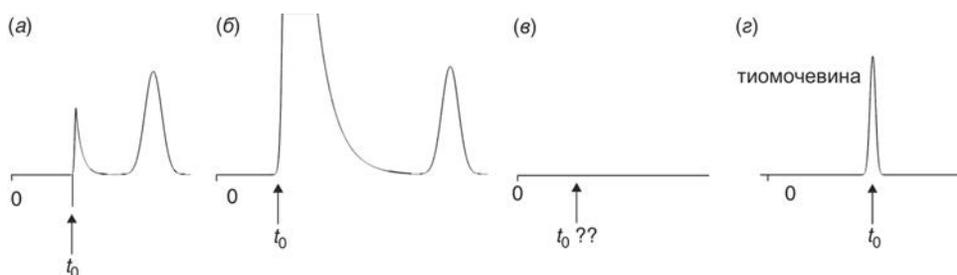


Рис. 2.5. Определение мертвого времени  $t_0$  колонки

В остальных случаях, особенно в тех, когда речь идет об анализе реакционной массы, проб из окружающей среды, растительных или животных экстрактов, в начале хроматограммы (рис. 2.5б) присутствует очень большой («неудерживаемый» или «мусорный») пик. Здесь значение  $t_0$  соответствует началу подъема пика. Иногда на хроматограмме можно и не увидеть пика растворителя (рис. 2.5в), тогда его определяют или вычисляют. Наиболее очевидный способ определения  $t_0$  — анализ не-удерживаемого ( $k = 0$ ) легко детектируемого вещества, растворенного в воде или подвижной фазе (рис. 2.5г). Если использовать УФ детектор с длиной волны менее 220 нм, то в качестве тестового образца можно взять тиомочевину. Для определения  $t_0$  также подходят урацил или концентрированные растворы солей, поглощающих в УФ, например, нитрата натрия [2–4]. Наблюдаемое значение  $t_0$  для одной и той же колонки может меняться в зависимости от состава подвижной фазы. Обычно колебания  $t_0$  составляют менее 5% в диапазоне 20–80 %В (%В означает объемное содержание в процентах органического компонента в подвижной фазе), а максимальные отклонения достигают  $\pm 10$ –15% при крайних значениях %В (0, 100 %В) [5]. Чтобы примерно оценить  $k$  (рис. 2.3д), достаточно предположить, что значение  $t_0$ , измеренное при одном %В, будет таким же при всех значениях %В (при условии, что меняется только %В).

С другой стороны, величину  $t_0$  можно оценить, основываясь на размерах колонки и величине скорости потока (для колонок, упакованных полностью пористыми частицами):

$$t_0 \approx 5 \times 10^{-4} \frac{Ld_c^2}{F}. \quad (2.7)$$

Здесь  $L$  — длина колонки в мм,  $d_c$  — внутренний диаметр колонки в мм,  $F$  — скорость потока в мл/мин и  $t_0$  в минутах. Оказалось, что для нескольких сотен разных ОФХ-колонок  $t_0$ , вычисленное по уравнению (2.7), совпадает с экспериментальными значениями  $t_0$  со средней ошибкой  $\pm 10\%$  (1 СКО) [6]. На практике такая точность вполне достаточна. Мертвый объем колонки  $V_m$  связан с  $t_0$  следующей зависимостью:

$$V_m = t_0 F \approx 5 \times 10^{-4} L d_c^2. \quad (2.7a)$$

где  $L$  и  $d_c$  измеряются в мм. Мертвый объем колонки  $V_m$  — это общий объем подвижной фазы внутри колонки, вне частиц сорбента и внутри их. Например,  $V_m = 2$  мл,  $F = 0,5$  мл/мин, тогда  $t_0 = V_m/F = 2/0,5 = 4$  мин.  $t_0$  можно расценивать как время, требуемое для полной замены подвижной фазы, которой колонка была изначально заполнена.

В общем случае для колонок с внутренним диаметром 4–5 мм удобно оценивать  $V_m$  соотношением (объединив уравнения 2.7 и 2.7a):

$$V_m(\text{мл}) \approx 0,01L. \quad (2.7б)$$

где длина колонки  $L$  в мм. Тогда зная  $V_m$ , можно получить значение  $t_0$ :  $t_0 = V_m/F$ . Дальнейшее обсуждение измерения, точности и смысла мертвого времени и мертвого объема колонки смотрите в работах [2–4]<sup>1</sup>.

### 2.3.2. Роль условий разделения и состава образца

Относительное влияние условий разделения на удерживание образца  $k$  обобщено во второй колонке таблицы 2.2. Данные таблицы 2.2 применимы к любым режимам разделения, но информация, изложенная ниже, касается обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ). Подвижная фаза, как правило, представляет собой смесь воды или водного буфера (элюент А) и органического растворителя (элюент В), такого как ацетонитрил или метанол. С увеличением объемной доли органического растворителя (%В) снижается удерживание всех компонентов образца. Подвижная фаза, при которой значения  $k$  уменьшаются, называется «сильной», то есть вода относится к «слабым» элюентам, а органические растворители — к «сильным». При увеличении доли элюента В на 10% значения  $k$  обычно снижаются в 2–3 раза. Влияние доли растворителя В на удерживание образца показано на примере разделения смеси из 5 гербицидов (рис. 2.6). Подвижная фаза, содержащая 80 %В, вызывает быстрое элюирование компонентов образца (рис. 2.6а) с небольшими значениями  $k$  (0,3–0,8), что приводит к плохому разделению. Если %В снизить (50 %В, рис. 2.6б), то разделение улучшится, но станет продолжительным (16 минут по сравнению

Таблица 2.2. Влияние условий разделения на удерживание ( $k$ ), селективность ( $\alpha$ ) и число теоретических тарелок ( $N$ )

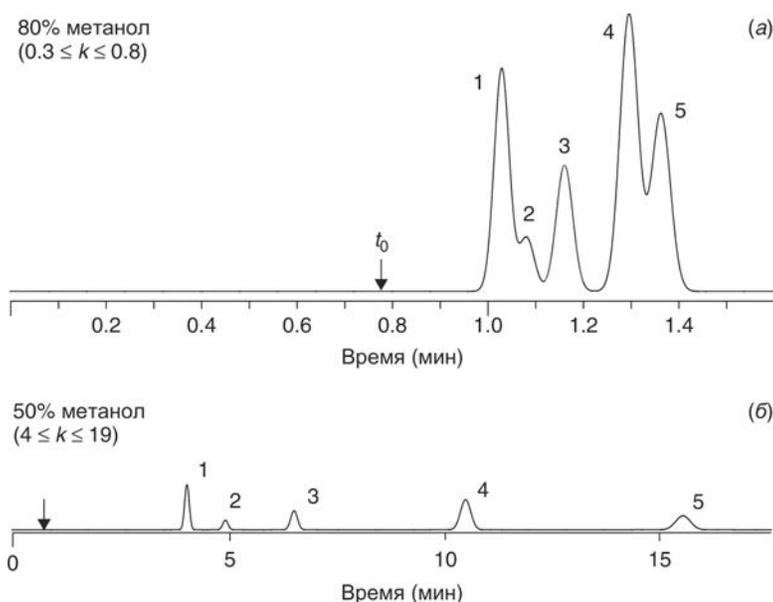
Условия разделения	$k$	$\alpha$	$N$
%В	++	+	-
Элюент В (ацетонитрил, метанол и т.д.)	+	++	-
Температура	+	+	+
Тип колонки (C <sub>18</sub> , фенил, циано и т.д.)	+	++	-
pH подвижной фазы <sup>a</sup>	++	++	+
Концентрация буфера <sup>a</sup>	+	+	-
Концентрация ион-парного реагента <sup>a</sup>	++	++	+
Длина колонки	0	0	++
Размер частиц	0	0	++
Скорость потока	0	0	+
Давление	-	-	+ <sup>b</sup>

Примечание: ++ сильное влияние, + умеренное влияние, - относительно небольшое влияние, 0 никакого влияния. Выделенные параметры (обозначенные ++) указывают на условия, которые лучше использовать в первую очередь (рекомендуются) для контроля за  $k$ ,  $\alpha$ ,  $N$  (например, чтобы контролировать  $k$  или  $\alpha$ , изменяют %В; длина колонки влияет на  $N$ ).

<sup>a</sup>Для ионизированных соединений (кислот или оснований).

<sup>b</sup>Более высокое давление позволит получить большие значения  $N$  при правильном выборе остальных условий. Впрочем, давление само по себе мало влияет на  $N$  (см. раздел 2.4.1.1 и 2.5.3.1).

<sup>1</sup>Приведенный в данном разделе подход предназначен лишь для оценки значения мертвого времени, но не может быть использован для физико-химических измерений. — Прим. перев.

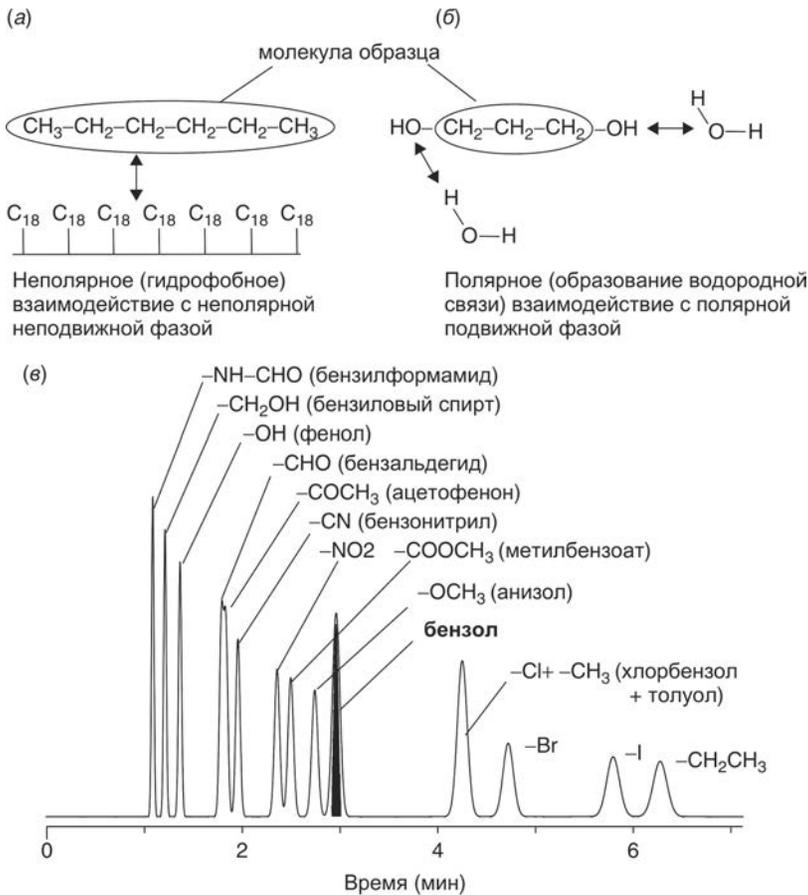


**Рис. 2.6.** Зависимость результатов разделения от %В в подвижной фазе (об. % метанола). Образец состоит из смеси гербицидов: 1 — монолинурон, 2 — метобромурон, 3 — диурон, 4 — пропазин, 5 — хлороксурон. Условия: колонка  $C_{18}$ ,  $150 \times 4,6$  мм, 5 мкм, подвижная фаза метанол — вода, скорость потока 2,0 мл/мин, комнатная температура. Хроматограмма смоделирована по данным работы [7]

с 1,5 минутами на рис. 2.6а). При этом из-за размывания высота пиков уменьшится. Как правило, подбирая необходимый %В, можно регулировать  $k$  в желаемом интервале. Кроме того, варьируя параметры, приведенные в таблице 2.2, можно контролировать селективность разделения (б) и эффективность колонки ( $N$ ). Более подробно см. раздел 2.5.

ОФХ предполагает неполярную неподвижную фазу (например,  $C_{18}$ ) и полярный водный элюент. Здесь работает принцип «подобное взаимодействует с подобным»: то есть полярные соединения (1,3-пропандиол) будут преимущественно взаимодействовать с полярной подвижной фазой (рис. 2.7б), а значит, будут менее удерживаемы (большие значения  $R$  и небольшие  $k$ ), а неполярные вещества ( $n$ -гексан), напротив, в основном будут взаимодействовать с неполярной стационарной фазой (рис. 2.7а), что приведет к более сильному удерживанию (небольшие  $R$  и большие  $k$ ). На рисунке 2.7в изображена хроматограмма нескольких монозамещенных бензолов, имеющих разную полярность или «гидрофобность» из-за наличия разных по своей природе заместителей. Полярные (менее гидрофобные) группы, например,  $-\text{NHCHO}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$  или  $-\text{OH}$  снижают удерживание по отношению к незамещенному бензолу (заштрихованный пик). Менее полярные (более гидрофобные) группы, например, хлор, метил, бром, йод и этил, наоборот, увеличивают удерживание.

Ионизированные кислоты и основания гораздо «полярнее», а значит, менее удерживаемы по сравнению с их нейтральными формами. Изменение pH подвижной фазы, которое приводит к повышению ионизации вещества, еще больше снижает удерживание (раздел 7.2).



**Рис. 2.7.** Полярность и удержание образца. Показано взаимодействие неполярного образца со стационарной фазой (а) и полярного образца с подвижной фазой (б); (в) влияние различных заместителей монозамещенных бензолов на удержание. Условия: колонка Нуперсил C<sub>18</sub> 150 × 4,6 мм, подвижная фаза 50% ацетонитрил/вода, скорость потока 2 мл/мин, 25 °С, хроматограмма смоделирована по данным работы [8]

### 2.3.2.1. Межмолекулярные взаимодействия

В этом разделе изложена информация, позволяющая более глубоко изучить вопрос зависимости удерживания от состава образца, колонки и подвижной фазы. Кроме того, здесь содержится больше материала, чем обычно требуется на практике. Поэтому читатель может его пропустить и перейти к следующему разделу 2.3.2.2, а сюда вернуться по мере необходимости.

Взаимодействие между ближайшими молекулами вещества и растворителя происходит благодаря различным межмолекулярным силам (рис. 2.8). В принципе, количественное понимание этих взаимодействий должно позволить оценить или даже предсказать зависимость удерживания от структуры молекулы. Хотя в настоящее время<sup>1</sup> сделать это практически невозможно (см. раздел 2.7.7), понимание этих взаимо-

<sup>1</sup> На момент написания книги. — Прим. перев.

действий в других ситуациях может оказаться полезным. Например, в выборе другой колонки при попытке изменить разделение (раздел 5.4).

**Дисперсионные взаимодействия** (рис. 2.8а) возникают в результате случайных, мгновенных смен положений электронов вокруг соседнего атома растворителя (*S*) или вещества (*X*). Обычно в каждый определенный момент электроны асимметрично окружают ядро *S* (рис. 2.8а), что приводит к тому, что электроны ближайшего атома *X* (из-за кулоновского отталкивания) перемещаются так, как показано на рисунке. В результате чего между молекулами *S* и *X* возникает мгновенный дипольный момент, который вызывает электростатическое притяжение. Сила дисперсионных взаимодействий зависит от поляризуемости двух соседних атомов. Чем больше размер молекулы (количество атомов или молекулярная масса) и показатель преломления [9], тем больше поляризуемость, поэтому дисперсионные взаимодействия сильнее для ароматических соединений и для молекул, у которых заместителями являются атомы с более высоким атомным весом (сульфид, хлорид, бромид и т.д.), при условии, что молекулы имеют примерно одинаковый размер.

Дисперсионные взаимодействия существуют между любыми двумя соседними атомами, и это взаимодействие во многом объясняет физическое притяжение между молекулами всех видов (особенно для менее полярных молекул). Из-за неспецифической и универсальной природы дисперсионных взаимодействий они значительны как в подвижной, так и в неподвижной фазе. Это приводит к тому, что дисперсионные взаимодействия, как правило, мало влияют на *селективность* разделения при смене подвижной фазы или колонки. Дисперсионные взаимодействия вносят вклад в *гидрофобные* взаимодействия, которые так называются из-за того, что они обуслов-

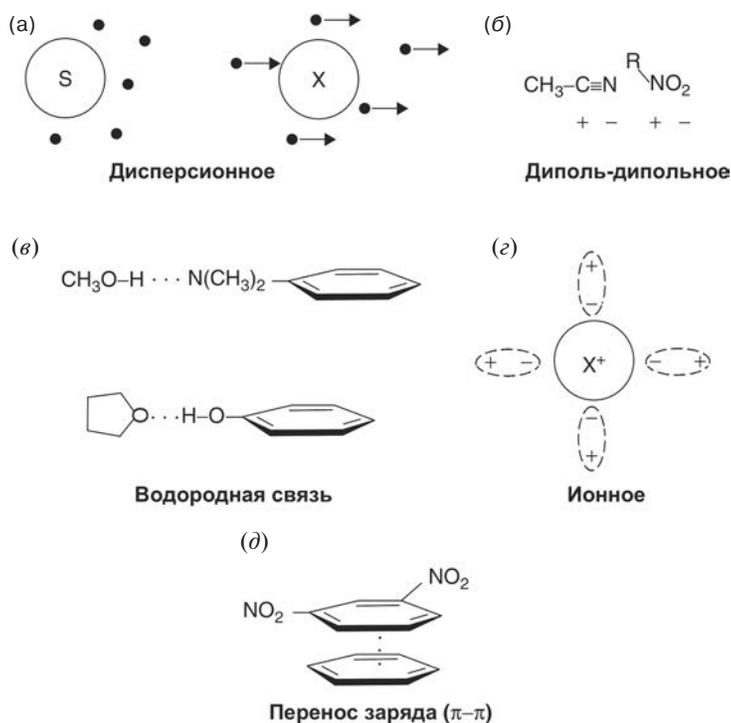


Рис. 2.8. Межмолекулярные взаимодействия, влияющие на удерживание образца и селективность.

ливают притяжения менее полярных соединений к неполярному обращенно-фазовому сорбенту (или вытеснение гидрофобных молекул из полярной водной фазы). С возрастанием силы дисперсионного взаимодействия (для более крупных и менее полярных образцов) происходит существенный рост удерживания.

*Диполь-дипольные* взаимодействия возникают между молекулами, имеющими постоянные или наведенные диполи. На рис. 2.8б изображено взаимодействие молекулы ацетонитрила ( $\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{N}$ ) и нитроалкана ( $\text{R}-\text{NO}_2$ ). У функциональных групп ( $-\text{C}\equiv\text{N}$  и  $-\text{NO}_2$ ) этих двух молекул есть большой постоянный дипольный момент, благодаря которому молекулы занимают такое положение, в котором электростатическое взаимодействие максимально (положительно заряженный полюс одной молекулы находится рядом с отрицательно заряженным полюсом другой). Сила дипольного взаимодействия пропорциональна дипольному моменту каждой из двух взаимодействующих групп, а не дипольному моменту целой молекулы (в которой может быть много заместителей), так как дипольные взаимодействия возникают только на очень близком расстоянии, например, между соседними атомами или группами.

*Водородные связи* возникают в двух случаях: кислотный (или протон-донорный) растворитель (метанол) взаимодействует с основным (протон-акцепторным) веществом (*N,N*-диметиланилин), или кислотное вещество (фенол) взаимодействует с основным растворителем (тетрагидрофуран, ТГФ) (рис. 2.8в). Сила взаимодействия увеличивается с увеличением кислотности и основности взаимодействующих групп (табл. 2.3).

Таблица 2.3. Параметры селективности растворителей

Растворитель	Приведенная селективность <sup>а</sup>			$P'^b$	$\epsilon^c$
	Кислотность ВС $\alpha/\Sigma$	Основность ВС $\beta/\Sigma$	Полярность $\pi^*/\Sigma$		
Уксусная кислота	0,54	0,15	0,31	6,0	6,2
Ацетонитрил	0,15	0,25	0,60	5,8	37,5
Алканы	0,00	0,00	0,00	0,1	1,9
Хлороформ	0,43	0,00	0,57	4,1	4,8
Диметилсульфоксид	0,00	0,43	0,57	7,2	4,7
Этанол	0,39	0,36	0,25	4,3	24,6
Этилацетат	0,00	0,45	0,55	4,4	6,0
Хлористый этилен	0,00	0,00	1,00	3,5	10,4
Метанол	0,43	0,29	0,28	5,1	32,7
Хлористый метилен	0,27	0,0	0,73	3,1	8,9
Метил- <i>т</i> -бутиловый эфир	0,00	≈0,6	≈0,4	≈2,4	≈4
Нитрометан	0,17	0,19	0,64	6,0	35,9
Пропанол ( <i>н</i> - или <i>изо</i> -)	0,36	0,40	0,24	3,9	6,0
Тetraгидрофуран	0,00	0,49	0,51	4,0	7,6
Триэтиламин	0,00	0,84	0,16	1,9	2,4
Вода	0,43	0,18	0,45	10,2	80

Примечание: дополнительная информация о растворителях приведена в Приложении I (табл. I.4).

<sup>а</sup>Значения из [11],  $\Sigma$  — это сумма параметров  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\pi^*$  каждого растворителя.

<sup>б</sup>Коэффициент полярности [12].

<sup>с</sup>Диэлектрическая постоянная [13].

Пример *ионных* (кулоновских) взаимодействий между положительно заряженным ионом образца ( $X^+$ ) и окружающими его поляризуемыми молекулами растворителя показан на рис. 2.8г. Под действием положительно заряженного иона в молекулах растворителя смещается заряд, что приводит к максимальному электростатическому взаимодействию. Сила ионных взаимодействий увеличивается с увеличением диэлектрической проницаемости  $\epsilon$  растворителя (табл. 2.3). Кроме того, ионные взаимодействия могут возникать между заряженными ионами образца и любыми ионами в подвижной или стационарной фазе. Более подробно этот вопрос обсуждается в разделе 7.4.1 (ион-парная хроматография) и разделе 7.5.1 (ионообменная хроматография).

*Перенос заряда или  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия* показаны на рисунке 2.8д на примере 1,3-динитробензола (обедненная электронами  $\pi$ -кислота) и бензола (насыщенное электронами  $\pi$ -основание). Взаимодействия такого рода возникают между любыми ароматическими (или ненасыщенными) соединениями. Причем, чем сильнее  $\pi$ -основания (такие как полициклические ароматические соединения, например, нафталин и антрацен) и  $\pi$ -кислоты (например, ароматические соединения, замещенные электроакцепторными нитрогруппами), тем сильнее  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия. Растворитель ацетонитрил, являющийся  $\pi$ -кислотой, тоже может вступать в  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия с ароматическими образцами [10].

Полярные взаимодействия различных неионных алифатических растворителей, применяемых в ВЭЖХ, можно представить в виде *треугольника селективности растворителей* (рис. 2.9, [11]). Положение каждого растворителя в треугольнике указывает на *относительную* кислотность его водородных связей  $\alpha/\Sigma$ , основность его водородных связей  $\beta/\Sigma$  и полярность  $\pi^*/\Sigma$ . Амины, например, относительно сильные основания (судя по положению в верхней части треугольника, большое значение  $\beta$ ). У нитроалканов, алифатических нитрилов, хлористого метилена есть группы с большими дипольными моментами, поэтому они располагаются в нижней правой части

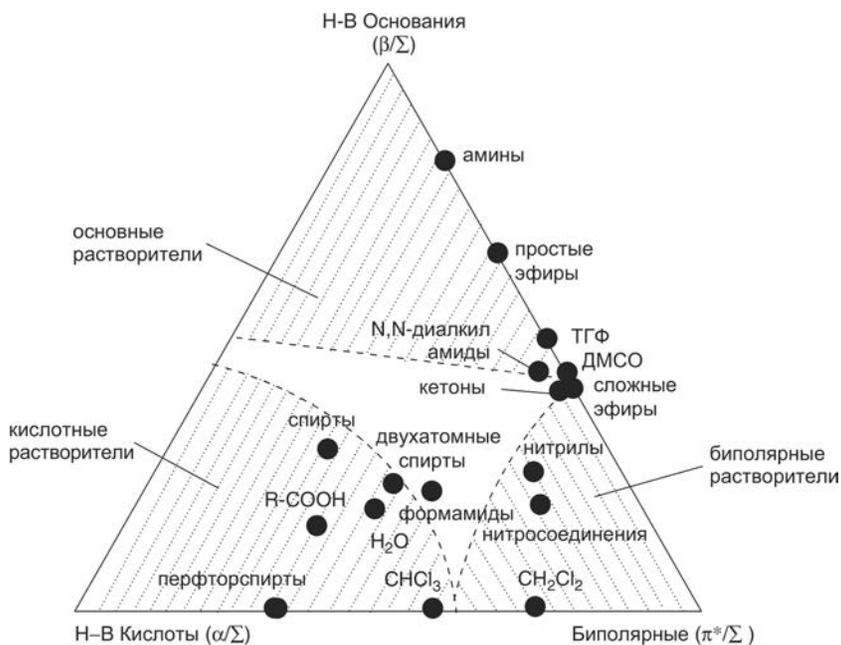


Рис. 2.9. Треугольник селективности разного рода алифатических растворителей. В таблице 2.3 приведены характеристики растворителей [11]

треугольника. Перфторспирты — очень сильные доноры водорода (и одновременно слабые акцепторы). Их, также как и карбоновые кислоты, можно найти в нижней левой части треугольника (большие значения  $\alpha$ ). В таблице 2.3 приведены:

1. Относительные вклады дипольных взаимодействий, кислотности и основности водородных связей в общую полярность растворителя;
2. Мера общей полярности растворителя ( $P'$ );
3. Диэлектрическая постоянная ( $\epsilon$ )

Чем больше  $\epsilon$  подвижной фазы, тем сильнее ионные взаимодействия в растворе (рис. 2.8г), тем лучше ионные образцы растворяются в подвижной фазе и тем меньше значения  $k$  для ионных образцов. Подробный обзор межмолекулярных взаимодействий в хроматографии см. [14].

Далее, в главах 6 и 8, мы еще раз вернемся к треугольнику селективности растворителей (рис. 2.9). В разделе 5.4 о селективности колонки аналогичным образом объяснены взаимодействия между образцом и сорбентом.

### 2.3.2.2. Температура

Температура — важный параметр в ВЭЖХ. Она оказывает существенное влияние на коэффициент удерживания. Удерживание большинства образцов в привычных условиях разделения зависит от температуры в соответствии с уравнением Ван-Гоффа:

$$\log k = A + \frac{B}{T_K}, \quad (2.8)$$

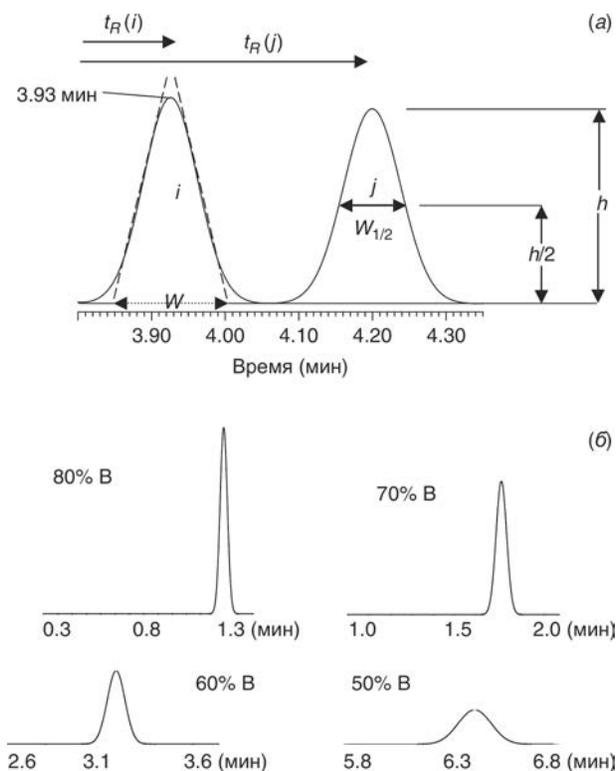
где  $A$  и  $B$  не зависящие от температуры константы для данного вещества,  $T_K$  — температура в градусах Кельвина (К). Обычно повышение температуры на один градус снижает  $k$  на 1—2%, т.е. при увеличении температуры на 50 °С удерживание уменьшается примерно в 2 раза. Повышение температуры зачастую негативно отражается на разделении, хотя высота пиков растет (как при увеличении доли растворителя  $B$  в элюенте, рис. 2.6). Следует отметить, что отклонения от уравнения (2.8) не так уж и редки, в результате чего наблюдается криволинейный участок на графике зависимости  $\log k$  от  $1/T_K$ . Повышение температуры очень редко *увеличивает* коэффициент удерживания. Исключения из уравнения (2.8) возможны, если при изменении температуры:

1. происходит изменение ионизации образца [15, 16];
2. меняется конформация образца [17] или свойства стационарной фазы [18].

Кроме того, температура влияет на количество теоретических тарелок и на перепад давления (раздел 2.4). Большинство термостатов хроматографических систем имеют температурные ограничения: не более 80 °С (раздел 3.7.2). Период эксплуатации колонки сокращается, если рабочая температура превышает 60 °С (раздел 5.8). Более подробно о роли температуры в ВЭЖХ написано в разделе 2.5.3.1 и [19—20а].

## 2.4. Ширина пика и число теоретических тарелок колонки $N$

Молекулы растворенного вещества (рис. 2.3), перемещаясь, распределяются по колонке и занимают объем, превышающий исходный (или образуют более широкую полосу). Вещество, вымываясь из колонки, на хроматограмме регистрируется в виде пика, ширину которого можно вычислить различными способами. На рис. 2.10а показана ширина  $W$  первого пика  $i$  на уровне базовой линии. К каждой стороне пика проводят касательные (через точки перегиба), пересечение которых с базовой линией



**Рис. 2.10.** Ширина пика и ее измерение. (а) Определение ширины пика; (б) зависимость ширины пика 3 рисунка 2.6 от %В. У всех пиков одинаковый масштаб

образует отрезок  $W$ . Когда в этой книге упоминается ширина пика, предполагается, что это значение  $W$  на уровне базовой линии. Относительная способность колонки давать узкие пики называется эффективностью и определяется числом теоретических тарелок  $N$ :

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2. \quad (2.9)$$

Например, ширина  $W$  пика *i* (рис. 2.10а) равна  $(4,00 - 3,85) = 0,15$  мин, время удерживания  $t_R = 3,93$  мин, тогда  $N = 16 \times (3,93/0,15)^2 = 10980$ . Значения  $N$  могут меняться в зависимости от образца, условий разделения и колонок (раздел 2.4.1). Чем больше  $N$ , тем уже пики на хроматограмме и тем лучше разделение.

Ширину пика удобнее (и точнее) определять по ширине пика на полувысоте  $W_{1/2}$  (показано для пика *j* на рисунке 2.10а). По данным систем сбора и обработки данных ширина пика на полувысоте  $W_{1/2} \cong 0,588W$ . Величину  $W_{1/2}$  также используют для определения  $N$ :

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2. \quad (2.9a)$$

Пик идеальной формы имеет вид Гауссовой кривой (раздел 2.4.2), и поэтому ширину пика иногда выражают как стандартное отклонение у Гауссовой кривой, то есть

$$W = 4\sigma. \quad (2.9б)$$

Тогда

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2. \quad (2.9в)$$

Уравнение (2.9в) можно представить в другом виде, например:  $N = 25(t_R/W_{5\sigma})^2$ , где  $W_{5\sigma} = 1,25W$  так называемая ширина пика  $5\sigma$ .

Уравнение (2.9) можно записать в виде

$$W = 4N^{-0,5}t_R, \quad (2.10)$$

или (заменяв  $t_R$  уравнением (2.5))

$$W = 4N^{-0,5}t_0(1 + k). \quad (2.10а)$$

Поскольку для разных пиков на хроматограмме значения  $N$  практически постоянны, то уравнение (2.10) говорит о том, что ширина пика  $W$  увеличивается пропорционально времени удерживания. То есть на хроматограмме от ее начала и до ее конца наблюдается непрерывное увеличение ширины пика (см. например, хроматограмму на рис. 2.7в).

При изменении времени удерживания, которое меняется в зависимости от %В, температуры или колонки, площадь пика, как правило, остается постоянной, поэтому и произведение высоты пика  $h_p$  на ширину пика  $W$  тоже должно остаться постоянным. Таким образом

$$h_p \approx \frac{(\text{константа})}{W} \approx \frac{(\text{константа})}{t_R}. \quad (2.11)$$

Следовательно, с увеличением  $t_R$ , высота пика падает. Пример зависимости высоты пика от %В показан на рисунке 2.10б для пика 3 рисунка 2.6. Видно, что при варьировании %В высота и ширина пика изменяются обратно пропорционально (что подтверждает уравнение (2.11)).

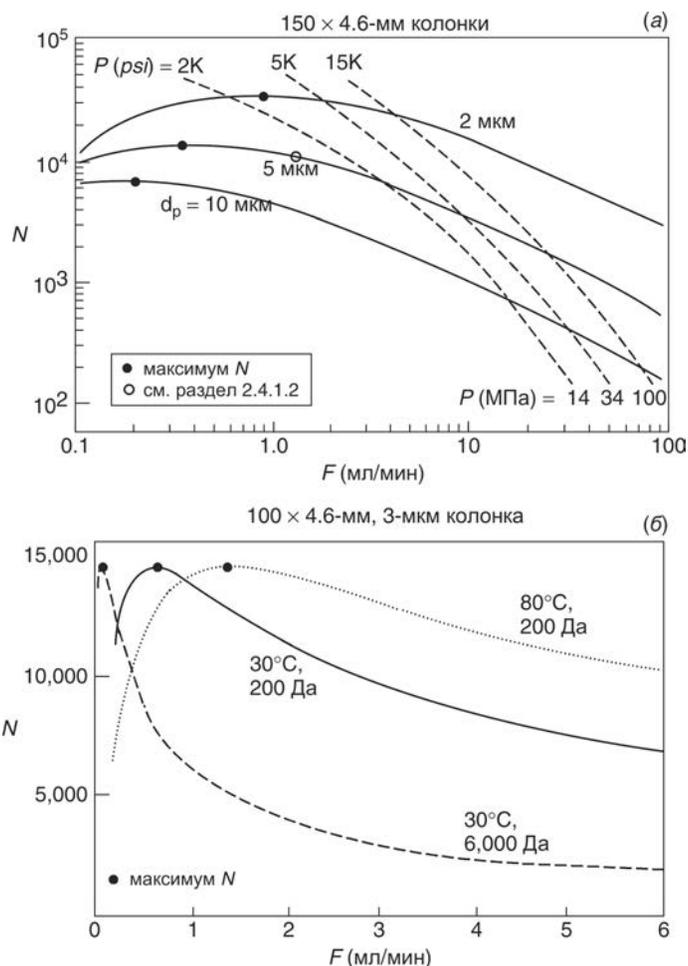
### 2.4.1. Зависимость $N$ от условий разделения

Начнем этот раздел с обобщения некоторых практических выводов относительно зависимости числа теоретических тарелок  $N$  от колонки, образца и условий эксперимента. Теория следующего раздела 2.4.1.1 именно на них и основывается. Число тарелок также можно описать следующим уравнением

$$N = \left(\frac{1}{H}\right)L, \quad (2.12)$$

где  $H = L/N$  — *высота теоретической тарелки*.  $H$  показатель эффективности колонки на единицу ее длины. Увеличение длины колонки (путем замены колонки длиной 150 мм на колонку длиной 250 мм) — очень удобный способ повысить  $N$  и улучшить разделение (поскольку  $H$  постоянна, отличается только длина колонок).

Рассмотрим следующий график в двойном логарифмическом масштабе (рис. 2.11а), на котором показана зависимость  $N$  от скорости потока  $F$  и диаметра частиц  $d_p$  (2, 5 или 10 мкм), при этом другие параметры разделения остаются постоянными. При увеличении скорости подвижной фазы  $F$ , начиная со значения 0,1 мл/мин, число теоретических тарелок  $N$  сначала увеличивается, а потом падает. Так при данных условиях максимальное значение  $N$  (обозначено ●) в зависимости



**Рис. 2.11.** Изменение числа теоретических тарелок  $N$  в зависимости от скорости потока  $F$ , размера частиц  $d_p$  и других условий. Подвижная фаза — 50% ацетонитрил в воде. (а) Условия: колонка 150 × 4,6 мм, 30 °С, молекулярная масса образца 200 Да; (---) изобара зависимости  $N(F)$  при  $P = 136$  бар (2000 psi), 340 бар (5000 psi) и 1020 бар (15000 psi), соответственно. (б) Условия: колонка 100 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм, остальные условия указаны на рисунке. Все графики построены по уравнению (2.18а), где  $A = 1$ ,  $B = 2$  и  $C = 0,05$

от размера частиц  $d_p$  наблюдается при значениях  $F = 0,2 - 1,0$  мл/мин. Трехкратное увеличение скорости потока относительно «оптимального» значения  $F_{opt}$ , при котором  $N$  максимально, почти никак не сказывается на самом разделении (только лишь снижает  $N$  примерно на 20%), но сокращает его продолжительность в три раза. Поэтому на практике обычно используют скорость потока выше оптимального значения. Не рекомендуется устанавливать скорость потока ниже  $F_{opt}$ , поскольку помимо снижения числа тарелок увеличивается продолжительность разделения.

Размер частиц влияет на число теоретических тарелок: чем меньше  $d_p$ , тем больше  $N$  (рис. 2.11а). При уменьшении размера частиц максимальное значение  $N$  достигается при более высокой скорости потока, что позволяет сократить продолжительность разделения (раздел 2.4.1.1). С маленькими частицами и высокими скоростями потока перепад давления в колонке (будем его называть просто «давление»  $P$ ) возрастает (штриховые линии на рисунке 2.11а при  $P = 136$  бар (2000 psi), 340 бар (5000 psi) и 1020 бар (15000 psi)). Давление (в psi) в упакованной колонке можно определить по уравнению

$$P \approx \frac{1,25L^2\eta}{t_0d_p^2} \quad (2.13)$$

или из уравнений (2.7) и (2.13)

$$P \approx \frac{2500L\eta F}{d_p^2d_c^2}, \quad (2.13a)$$

где  $L$  — длина колонки в мм,  $\eta$  — вязкость подвижной фазы в сП (значения  $\eta$  в зависимости от состава подвижной фазы и температуры приведены в Приложении I),  $t_0$  в минутах,  $F$  — скорость потока в мл/мин,  $d_c$  — внутренний диаметр колонки в мм,  $d_p$  — диаметр частиц в мкм. В ВЭЖХ, помимо psi, иногда используют другие единицы измерения давления: бар  $\equiv$  атмосфера = 14,7 psi, мегапаскаль (МПа) = 10 бар = 147 psi.

На давление влияют также природа сорбента и качество упаковки колонки (раздел 5.6). Капилляры от насоса до детектора, кран инжектора, ячейка детектора вносят свой вклад в общее давление, определяемое на выходе из насоса. Однако суммарный их вклад невелик (10–20%) по сравнению с давлением, вычисленным по уравнению (2.13). Исключение составляют ВЭЖХ-системы, предназначенные для работы при давлении  $> 400$  бар, с размером частиц сорбента менее 3 мкм, которые и в отсутствие колонки демонстрируют высокое сопротивление потоку (например,  $\geq 70$  бар). В зависимости от ВЭЖХ-оборудования или проницаемости колонки отклонение от давления, определенного по уравнениям (2.13) и (2.13а), может составлять  $\pm 20\%$  и даже больше. Несмотря на способность большинства обычных ВЭЖХ-систем работать в диапазоне 340–400 бар, рекомендуется ограничить перепад давления до 200 бар (раздел 3.5). Со временем давление в колонке увеличивается, поэтому давление на новой колонке, предназначенной для обычных анализов, не должно превышать 150 бар. Впрочем последняя рекомендация устарела, так как в настоящее время имеющиеся в продаже ВЭЖХ-системы для рутинных задач вполне выдерживают 600–1000 бар и даже больше (раздел 3.5.4.3, [21]).

Теперь рассмотрим рисунок 2.11б: разделение проводят на колонке  $100 \times 4,6$  мм с частицами 5 мкм, подвижная фаза содержит 50% ацетонитрила (обратите внимание на двойной линейный масштаб и более узкий и типичный интервал значений  $F$ ). Графики зависимости  $N$  от  $F$  построены для трех различных условий: 1) 30 °С и образец с молекулярной массой 200 Да, 2) 30 °С и образец с молекулярной массой 6000 Да (крупный пептид), 3) 80 °С и образец с молекулярной массой 200 Да. Эти графики для каждого из образцов выглядят сходным образом, за исключением того, что максимум  $N$  или оптимальная  $F_{opt}$  сдвигается вправо (к большим значениям) при увеличении температуры, и влево (к меньшим значениям) при увеличении размера молекулы. Из этого можно сделать следующее заключение: разделение при повышенной температуре лучше проводить при высокой скорости потока, что, в свою очередь, сокращает продолжительность анализа (раздел 2.5.3.1). Похожие разделения образцов с большой молекулярной массой при сравнимых значениях  $N$ , как правило, требуют уменьшения скоростей потока, что удлиняет анализ. Зависимость  $N$  от геометрических размеров колонки, молекулярной массы образца и других условий обобщена в таблице 2.4.

Таблица 2.4. Влияние различных экспериментальных условий на  $N$ 

Условия	Влияние на $F_{opt}$ , величина $F$ для получения максимального $N$	Влияние увеличения указанных в графе «условия» параметров на $N$ и $P^a$
Длина колонки $L$	Никакого	$N$ и $P$ увеличиваются пропорционально
Диаметр колонки $d_c$	$F_{opt} \propto d_c^2$	Никакого, если $F$ увеличивается пропорционально $d_c^2$ (что рекомендуется)
Размер частиц $d_p$	$F_{opt} \propto 1/d_p$	$N$ падает (рис. 2.12) и $P$ тоже
Скорость потока подвижной фазы $F$	Никакого	$N$ падает (рис. 2.12), $P$ пропорционально растет
Вязкость подвижной фазы $\eta$	$F_{opt}$ падает с увеличением $\eta$	$N$ падает (уравн. 2.19), $P$ пропорционально растет
Температура $T$ (К)	$F_{opt}$ увеличивается с увеличением $T^b$	$N$ увеличивается (рис. 2.13в), $P$ снижается
Молекулярная масса образца $M$	$F_{opt} \propto M^{-0,6}$	$N$ падает (рис. 2.13в), никакого влияния на $P$

Примечание. См. обсуждение рисунков 2.12 и 2.13.

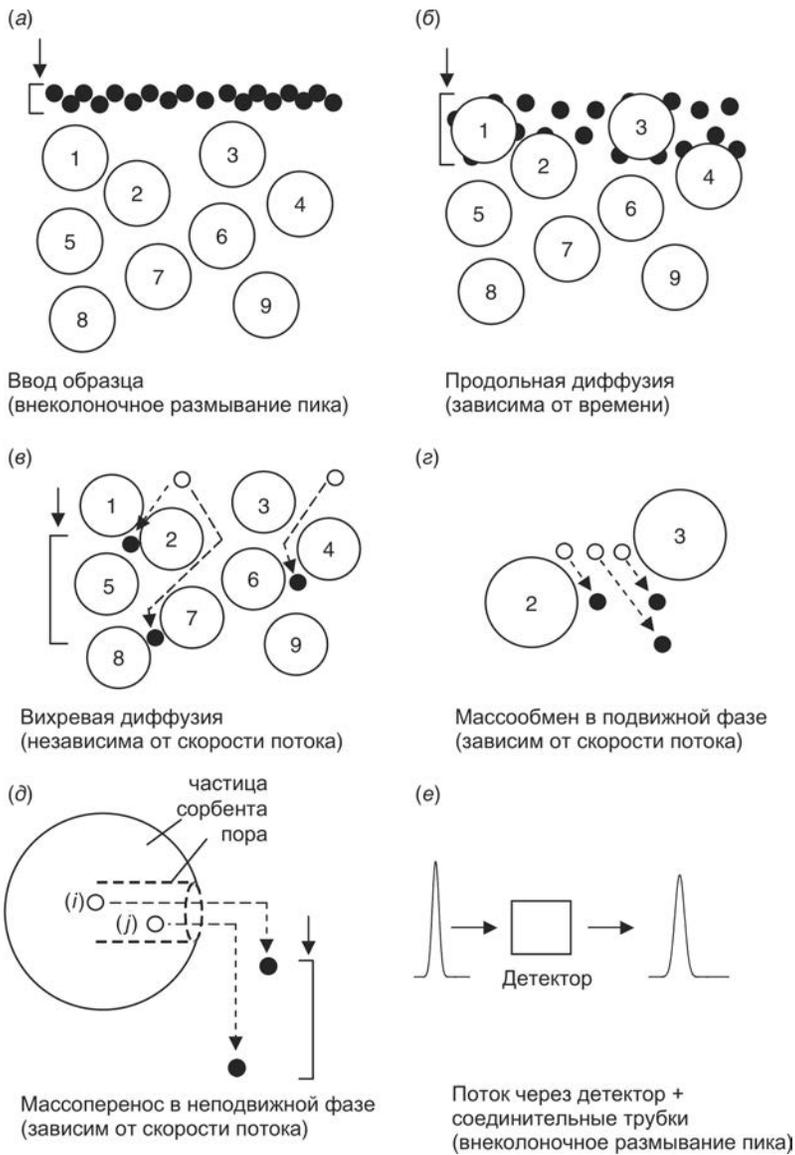
<sup>a</sup>Предполагается, что скорость потока равна или превышает оптимальное значение для максимального  $N$  ( $F_{opt}$ ), как это часто и делается.

<sup>b</sup>Из-за увеличения  $T$  и уменьшения вязкости подвижной фазы (ур-ние 2.19).

#### 2.4.1.1. Процессы размывания пика, определяющие значения $N$

Ширина  $W$  и время удерживания  $t_R$  пика определяют число теоретических тарелок  $N$  колонки (уравнение 2.9). Различные процессы, протекающие внутри и снаружи колонки, влияют на объем, в котором выходит пик, или его ширину  $W$ , как это показано на рис. 2.12. Обратите внимание на уширение полосы, происходящее в результате каждого процесса (рис. 2.12а-д). На это указывают скобки и стрелки около полосы образца. Когда проба из инжектора попадает в систему, но еще не достигает колонки, она занимает определенный, обычно небольшой, объем в капилляре (раздел 2.6.1). Это показано на рисунке 2.12а, где каждая отдельная молекула образца обозначена  $\bullet$ . Обычно *внеколоночное* уширение полосы вещества можно не принимать во внимание (раздел 3.9), но эта возможность зависит от характеристик хроматографа и размеров колонки (колонки небольшого объема, упакованные мелкозернистым сорбентом, больше всего подвержены *внеколоночному* размыванию пика). Рассмотрим *продольную диффузию* вещества в колонке (рис. 2.12б). Этот процесс вызывает увеличение ширины пика со временем, и он возникает вне зависимости от того, течет подвижная фаза или нет. Время, затрачиваемое веществом при его прохождении через колонку, обратно пропорционально скорости потока, поэтому вклад в уширение полосы от продольной диффузии уменьшается при большей скорости потока.

*Вихревая диффузия* вносит свой вклад в уширение пика (рис. 2.12в). Молекулы вещества по мере передвижения по колонке переносятся между частицами сорбента потоком подвижной фазы в различных направлениях (указано стрелками). Молекулы, попадающие в более медленно движущиеся потоки в суженных каналах между частицами, отстают, а быстрые потоки в более широких каналах уносят молекулы вперед. Такое распределение молекул почти не зависит от скорости потока, а зависит от взаимного расположения и размера частиц сорбента. В плохо упакованной колонке вихревая диффузия еще больше способствует размыванию полосы вещества. *Массообмен в подвижной фазе* (рис. 2.12г) возникает вследствие неравномерной скорости потока (в центре потока она выше, чем на периферии). С увеличением скорости



**Рис. 2.12.** Иллюстрация различных процессов, влияющих на размывание пика в процессе ВЭЖХ-разделения. Молекулы растворенного вещества до перемещения обозначены ○, после — ●, — — — → указывает направление движения молекул вещества

элюента молекулы в центральной части потока перемещаются быстрее, что вызывает еще большее размывание пика.

Последний процесс, который вносит свой вклад в размывание полосы вещества внутри колонки, — *массоперенос в стационарной фазе* (рис. 2.12д). Некоторые молекулы образца попадают глубоко в поры частиц (благодаря диффузии) и застревают там на какое-то время (например, молекула  $i$  на рис. 2.12д). В это время другие моле-

кулы (например,  $j$ ) неглубоко проникают в поры, надолго там не задерживаются и быстро вымываются из них. Молекулы, проводящие мало времени в частицах сорбента, перемещаются быстрее внутри колонки, увеличивая тем самым размытие полосы вещества. Чем выше скорость потока, тем больше размытие. В итоге пик элюируется из колонки и проходит через детектор (рис. 2.12e), при этом происходит дополнительное внеколоночное размытие, аналогичное размытию на линии в промежутке от инжектора до колонки (рис. 2.12a).

Каждый процесс вносит свой вклад в размытие пика (рис. 2.12) и влияет на окончательную ширину пика  $W$

$$W^2 = \sum W_i^2, \quad (2.14)$$

где  $W_i$  — вклад каждого (независимого) процесса  $i$  в окончательную ширину пика. Можно разделить процессы, протекающие внутри колонки и вне ее. Пусть  $W_{EC}$  — суммарное внеколоночное размытие (рис. 2.12a и 2.12e), а  $W_0$  — суммарное внутриколоночное размытие, тогда

$$W^2 = W_{EC}^2 + W_0^2. \quad (2.14a)$$

В правильно собранной ВЭЖХ-системе внеколоночное размытие  $W_{EC}$  должно быть небольшим (раздел 3.9), поэтому далее это слагаемое не будет приниматься во внимание при обсуждении. Величина  $W_{EC}$ , в отличие от  $W_0$ , не зависит от  $k$  (уравнение 2.10a), поэтому вклад внеколоночного размытия в общую ширину пика будет больше для ранозелюируемых соединений.

*Оставшаяся часть этого раздела и раздел 2.4.1.2 могут оказаться очень полезными для правильного понимания того, как величина  $N$  зависит от экспериментальных условий. Кроме того, этот материал закладывает основы, позволяющие, с одной стороны, понять как разработать методы экспресс-разделения (раздел 2.5.3.2), а с другой стороны, правильно оптимизировать эффективность колонки и разделения. Информация, изложенная ниже, не очень важна в повседневной работе, она может оказаться несколько сложной и ее можно пропустить, перейдя сразу к разделу 2.4.2, а к разделам 2.4.1.1 и 2.4.1.2 вернуться позже. Тем не менее, материал, начинающийся с уравнения (2.17), и особенно раздел 2.4.1.2 может оказаться полезным с практической точки зрения и заслуживает внимания читателя. Развернутое обсуждение теории размытия пиков также приводится в работах [22–25].*

Величину  $W_0$  теперь будем считать эквивалентной ширине пика  $W$  (уравнение 2.10), ее можно выразить через уравнение (2.14):

$$W^2 = \underbrace{W_L^2}_{\text{Продольная диффузия}} + \underbrace{W_E^2}_{\text{Вихревая диффузия}} + \underbrace{W_{MP}^2}_{\text{Массоперенос в подвижной фазе}} + \underbrace{W_{SP}^2}_{\text{Массоперенос в неподвижной фазе}}. \quad (2.15)$$

Объединив уравнения (2.10) и (2.12), получим:

$$W^2 = \left[ \left( \frac{16}{L} \right) t_R^2 \right] H, \quad (2.15a)$$

где значения  $H = L/N$  для разных веществ в одних и тех же экспериментальных условиях практически не зависят от времени удерживания  $t_R$  для колонки длиной  $L$ . Поэтому

$$W^2 \approx (\text{константа}) H. \quad (2.15b)$$

Если вместо  $W^2$  подставить величину  $H$  из уравнения (2.15b), то уравнение (2.15) будет напрямую связано с  $N$ :

$$H = H_L + H_E + H_{MP} + H_{SP}, \quad (2.16)$$

где  $H_L$ ,  $H_E$ ,  $H_{MP}$  и  $H_{SP}$  коррелируют с соответствующими  $W$  в уравнении (2.15), т.е., например, параметр  $H_L$  соответствует продольной диффузии и вносит свой вклад в  $H$

и т.д. Если мы вернемся к обсуждению рисунка 2.12, отметив, что значения  $W^2$  пропорциональны значениям  $H$  (уравнение 2.156), то исходя из теоретических уравнений для каждого из четырех вкладов в величину  $W$ , можно получить следующее выражение:

$$H = \underbrace{A}_{\text{Вихревая диффузия}} + \underbrace{B/F}_{\text{Продольный массоперенос}} + \underbrace{CF}_{\text{Массоперенос в подвижной и неподвижной фазах}} \quad (2.16a)$$

где коэффициенты  $A$ ,  $B$  и  $C$  — это константы для конкретных вещества, колонки и экспериментальных условий. Если в уравнении (2.16a) вместо  $F$  подставить линейную скорость подвижной фазы  $u$ , то получится уравнение Ван-Деемтера:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu, \quad (2.16b)$$

где параметры  $A$ ,  $B$  и  $C$  обозначают различный набор констант, относящихся к конкретному веществу, колонке и экспериментальным условиям.

Уравнения (2.16a и б) не совсем точны, поскольку допускают независимость всех четырех слагаемых  $W$  друг от друга. Чего не скажешь о вихревой диффузии и массопереносе в подвижной фазе. Всякий раз, когда два потока, текущие между частицами, встречаются, происходит смешивание и изменение профиля скоростей, возникшего вследствие массопереноса в подвижной фазе (так называемое сопряжение). Поэтому и вихревую диффузию, и массоперенос в подвижной фазе следует рассматривать как единый процесс размывания полосы. Поскольку массоперенос в подвижной фазе зависит от скорости потока ( $\propto F^1$ ), а вихревая диффузия — нет ( $\propto F^0$ ), то уширение пика под действием этих двух процессов будет описываться степенной зависимостью  $F$  с дробным показателем ( $F^n$ ). Эксперименты дают основание предполагать, что объединённая величина  $H$  для вихревой диффузии и массопереноса в подвижной фазе зависит от скорости потока в степени  $1/3$ . Тогда

$$H = \underbrace{B/F}_{\text{Продольная диффузия}} + \underbrace{AF^{1/3}}_{\text{Вихревая диффузия + массоперенос в подвижной фазе}} + \underbrace{CF}_{\text{Массоперенос в неподвижной фазе}}$$

( $A$ ,  $B$ ,  $C$  — константы). И, наконец, обобщенную взаимосвязь уширения пика и экспериментальных условий можно получить следующим образом: принять, что параметры  $A$ ,  $B$  и  $C$  в свою очередь в различной степени зависят от коэффициента диффузии  $D_m$  и/или диаметра частиц  $d_p$ , поэтому уравнение (2.16) будет выглядеть так:

$$h = Av^{0,33} + \frac{B}{v} + Cv. \quad (2.17)$$

Это так называемое уравнение Нокса [25]. Для «усредненного» разделения коэффициенты уравнения (2.17) можно принять равными  $A = 1$ ,  $B = 2$ ,  $C = 0,05$  (эти значения очень приблизительны и в некоторой степени зависят от  $k$ , природы колонки и качества ее упаковки). Теперь дадим определения *приведенной высоты теоретической тарелки*  $h$ :

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (2.18)$$

и *приведенной скорости*  $v$ :

$$v = \frac{u_e d_p}{D_m}, \quad (2.18a)$$

$u_e$  — интерстициальная скорость подвижной фазы (скорость движения элюента между частицами сорбента), которая отличается от средней линейной скорости подвиж-

ной фазы  $u$ ; в уравнениях (2.18) и (2.18а) используются единицы измерения системы СГС (см  $\times$  г  $\times$  с). Общая пористость колонки (доля свободного объема колонки) обозначается  $\varepsilon_T$  и включает объем пор частиц  $\varepsilon_i$  и объем между частицами  $\varepsilon_e$ . При этом  $u_e$  равна  $(\varepsilon_T/\varepsilon_e)u$ , где  $(\varepsilon_T/\varepsilon_e) \approx 1,6$ .

Коэффициент диффузии вещества  $D_m$  (см<sup>2</sup>/сек) зависит от его молекулярного объема ( $V_A$ , в мл), температуры ( $T$ , в градусах Кельвина) и вязкости подвижной фазы ( $\eta$  в сП). Это уравнение Вилки-Чанга[26]:

$$D_m = 7,4 \times 10^{-8} \frac{(\psi_B M_B)^{0,5} T}{\eta V_A^{0,6}} \frac{\text{см}^2}{\text{с}}, \quad (2.19)$$

где  $M_B$  — молекулярная масса растворителя,  $\psi_B$  — коэффициент ассоциации, равный единице для большинства растворителей и больше единицы для растворителей, способных формировать сильные водородные связи. Например,  $\psi_B$  воды равен 2,6, а метанола — 1,9 (в условиях обычной ОФХ можно принять значение  $\psi_B \approx 2$ ). Уравнение (2.19) достаточно точно для веществ, молекулярные массы которых меньше 500 Да, и может оказаться полезным для приблизительной оценки величин  $D_m$  более крупных молекул.

Уравнение Нокса (2.17) дает основу для оптимизации условий разделения, то есть позволяет оценить, каким образом можно получить максимальное  $N$  за минимальное время анализа. На результатах анализа этого уравнения также основаны прогнозы, приведенные в таблице 2.4, и графики на рис. 2.11. Таким образом, *можно хотя бы приблизительно предположить, как будет меняться  $N$  при изменении тех или иных экспериментальных условий*. Для того, чтобы применить уравнение Нокса (2.17) на практике, необходимо связать  $v$  с объемной скоростью потока. Это можно сделать, выразив  $F$  через уравнения (2.4а) и (2.7):

$$F \approx 0,0005 d_c^2 u, \quad (2.20)$$

где  $F$  — объемная скорость потока в мл/мин,  $d_c$  — диаметр колонки в мм, линейная скорость подвижной фазы  $u$  в мм/мин. Преобразуем уравнение (2.18а) с учетом того, что  $u$  в мм/мин,  $d_p$  в мкм,  $D_m$  в см<sup>2</sup>/с, а  $u_e = 1,6u$ :

$$v = \frac{2,7 \times 10^{-7} u d_p}{D_m}. \quad (2.20а)$$

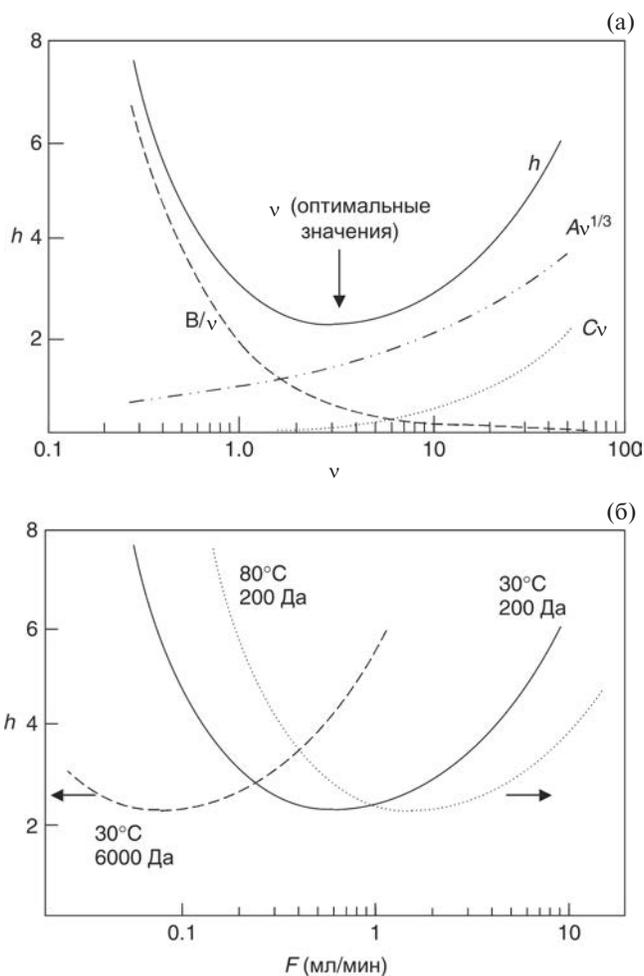
Объединим уравнения (2.20) и (2.20а) и получим:

$$v \approx \frac{5,4 \times 10^{-4} F d_p}{d_c^2 D_m} \quad (2.20б)$$

и

$$F = \frac{1850 d_c^2 v D_m}{d_p}. \quad (2.20в)$$

На рис. 2.13а изображен график зависимости  $h(v)$  (—), построенный по уравнению (2.17); при этом предполагается, что  $A = 1$ ,  $B = 2$ ,  $C = 0,05$ . Этот график не зависит от экспериментальных условий, перечисленных в таблице 2.4, поэтому он применим (приблизительно) ко *всем* условиям. Из рисунка 2.13а видно, что минимальное значение  $h \equiv h_{onm} \approx 2$  соответствует значению  $v \equiv v_{onm} \approx 3$ . («оптимальные»  $h$  и  $v$  — это те значения, которые соответствуют максимальному  $N$ ). Сплошная кривая на рис. 2.13б повторяет сплошную кривую рис. 2.13а, за исключением того, что по оси абсцисс отложена не приведенная скорость потока  $v$ , а *объемная скорость  $F$*  (при определенных условиях: 50% ацетонитрил-вода, 30 °С, диаметр колонки 4,6 мм, молекулярная масса образца 200 Да). Изменение любых условий, перечис-



**Рис. 2.13.** Уравнение Нокса. (а) Зависимость приведенной высоты теоретической тарелки  $h$  от приведенной скорости  $v$ , где  $A = 1$ ,  $B = 2$ ,  $C = 0,05$ . Сплошной кривой изображена зависимость общей высоты теоретической тарелки  $h$ , а пунктирными и прерывистыми линиями показаны зависимости трех составляющих ее компонентов. (б) Влияние молекулярной массы образца (6000 Да и 200 Да) и температуры (80 °С и 30 °С) на зависимость приведенной высоты теоретической тарелки  $h$  от объемной скорости потока  $F$ . Все графики построены по уравнению (2.17) с параметрами  $A = 1$ ,  $B = 2$ ,  $C = 0,05$

ленных в таблице 2.4, будет смещать график для данного образца (200 Да, 30 °С, рис. 2.13б) влево или вправо. Характер смещения будет зависеть от скорости потока, соответствующей максимальному  $N$  ( $F_{opt}$  соответствует  $v_{opt} \approx 3$ ). В соответствии с прогнозами таблицы 2.4  $F_{opt}$  растет с увеличением температуры, что мы и видим на рис. 2.13б (прерывистая кривая), а с увеличением молекулярной массы происходит падение  $F_{opt}$  и график  $h(v)$  сдвигается влево (пунктирная кривая). Заменяв на оси ординат  $h$  на  $N$  (уравнения 2.12 и 2.18), мы из кривой на рис. 2.13б получим график, изображенный на рис. 2.11б.

Как же зависит  $F_{opt}$  от условий, перечисленных в таблице 2.4? Любое изменение условий разделения, которое влияет на размер частиц  $d_p$  или коэффициент диффузии  $D_m$  при неизменной линейной скорости  $u$  (или объемной скорости потока  $F$ ), влечет за собой изменение  $v$ . Чтобы компенсировать это влияние и сохранить  $v_{opt} \approx 3$ , при котором наблюдается минимальное  $h$  и максимальное  $N$ , надо корректировать скорость потока  $F$ . Например, при повышении температуры коэффициент диффузии  $D_m$  увеличивается пропорционально некоторой величине  $x$  (уравнение 2.19), и, следовательно,  $v$  снижается в  $x$  раз (уравнение 2.18а). Значит, чтобы компенсировать повышение температуры и удерживать постоянное значение  $v = v_{opt}$ , надо скорость потока, соответствующую  $F_{opt}$ , также увеличить в  $x$  раз.

На рис. 2.13а изображены графики для каждого из трех компонентов уравнения (2.17). Стрелкой указано значение  $v$  ( $v \approx 3$ ,  $h \approx 2$ ), соответствующее минимуму  $h$  и максимуму  $N$ . Позже исходное уравнение Нокса было преобразовано, и были получены новые соотношения, которые, как утверждается, дают более точные результаты, пригодные для решения широкого спектра задач, и/или обеспечивают более глубокое понимание основ эффективности колонки [27-32]. Кроме того, когда учитывается диффузия в неподвижной фазе [35], параметры  $B$  и  $C$  будут зависеть от  $k$  растворенного вещества [33, 34]. Следовательно, уравнение (2.17) полезно, главным образом в практической полуквантитативной работе. Его даже называли «чисто эмпирическим выражением» [36] (с чем авторы книги не согласны!). Тем не менее, ввиду его простоты и удобства, а также фундаментальной теоретической базы это уравнение по-прежнему рекомендуется использовать в повседневной работе.

#### 2.4.1.2. Несколько рекомендаций по выбору колонки

Когда говорят о *параметрах колонки*, имеют в виду ее длину и диаметр, размер частиц. При этом не забывают о скорости потока. Все вместе эти параметры определяют число теоретических тарелок  $N$ , продолжительность эксперимента и перепад давления на колонке  $P$ . Чем больше нужно теоретических тарелок, тем, как правило, продолжительнее разделение. Однако в случае, если колонка и система способны выдерживать большой перепад давления, повышение давления решает проблему выбора между числом теоретических тарелок и временем анализа: либо повышаем  $N$  при неизменном времени анализа, либо сокращаем время анализа, не меняя  $N$ . Выбор диаметра колонки зависит от задачи: в препаративных разделениях используют больший диаметр (глава 15), а с колонками меньшего диаметра работают, если:

1. необходимо повысить чувствительность, но при этом количество образца ограничено;
2. необходимо снизить объемную скорость потока в ЖХ-МС (раздел 4.14);
3. необходимо сократить потребление растворителей;
4. разделение проходит при очень высоком давлении (что позволяет свести к минимуму проблемы, вызванные нагревом внутри колонки, раздел 3.5.4.3).

Диаметр колонки  $d_c$  напрямую не оказывает какого-либо влияния на соотношение между  $N$ , продолжительностью разделения и  $P$ . Однако, чем уже колонка, тем меньше объем пика и тем больше вклад внеколоночного размывания. Значит, чем меньше диаметр колонки, тем больше возникает требований непосредственно к самому хроматографу. Равно как и работа при высоком давлении (больше чем 400 бар) требует наличия специального оборудования (раздел 3.3.5.4) и специальных колонок.

Когда принято решение относительно диаметра колонки, подобрать остальные *параметры колонки* поможет теория, изложенная в разделе 2.4.1.1. Далее будем считать, что в разделении участвуют небольшие молекулы массой менее 1000 Да. Как разделять более крупные молекулы описано в разделе 13.3.1 (см. также материал к рис. 2.11б). Рассмотрим три варианта:

**А.** в наличии есть колонки только одного типа (например, размером  $150 \times 4,6$  мм, упакованные частицами диаметром 5 мкм)

**Б.** в наличии есть колонки одного типа с одинаковым диаметром, но разной длины

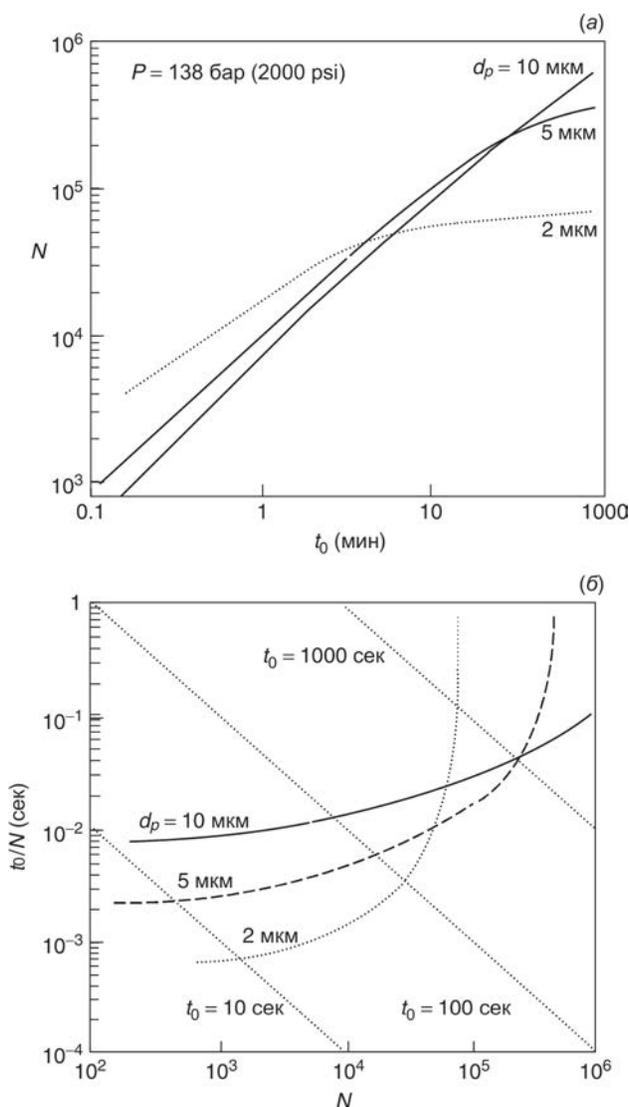
**В.** широкий выбор колонок разной длины, упакованных частицами разного размера.

Рассмотрим вариант А. Можно менять только скорость потока (как на рис. 2.11а), но существует максимально возможная скорость потока, которая определяется максимальными возможностями хроматографической системы или максимально возможным давлением для данной колонки (хотя часто желательнее работать при более низком давлении). То есть подбирают такое значение  $F$ , которому будет соответствовать необходимое число теоретических тарелок  $N$ , но при этом не будет превышено некое максимальное давление. Например, предположим, что для колонки  $150 \times 4,6$  мм (рис. 2.11а) требуется  $N$  более 10000, при этом давление не должно превышать 136 бар. Видно, что скорость потока должна составлять примерно 2 мл/мин, что соответствует  $N = 10000$  и  $P < 136$  бар.

Вариант Б: можно менять скорость потока и длину колонки. Максимальное  $N$  за минимальное время будет тогда, когда комбинация  $F$  и  $L$  приведет к максимальному допустимому давлению. Из уравнения (2.13а) видно, что это эквивалентно тому, что произведение  $FL$  должно оставаться постоянным. На рис. 2.14а показана получающаяся зависимость  $N$  от времени анализа (для значений  $t_0$ ) для трех разных размеров частиц 2, 5 и 10 мкм. Из данных, представленных на этом рисунке, можно сделать следующий вывод: меньший размер частиц (2 мкм) позволяет сократить время анализа (и, соответственно, меньше требуется  $N$ ). Таким образом, для  $t_0 = 1$  мин наибольшее  $N$  будет у колонки, упакованной частицами 2 мкм, а для  $t_0 = 1000$  мин — у колонки с частицами 10 мкм. То есть, чем больше число теоретических тарелок требуется, тем крупнее должны быть частицы в колонке. Если для анализа достаточно небольшого числа теоретических тарелок, то лучше всего выбирать колонку, упакованную частицами малого диаметра — это приведет к более короткому времени анализа. Для анализов средней продолжительности (например,  $t_0 > 5$  минут) соответственно подойдут колонки с частицами промежуточного размера (5 мкм), которые, по сравнению с частицами меньшего размера, дают требуемое число теоретических тарелок за более короткое время.

По данным рис. 2.14а построен *кинетический* график или *график Поппе* [37, 38] (рис. 2.14б). Это график зависимости времени, необходимого для образования одной теоретической тарелки ( $t_0/N$ ), от величины  $N$ . Видно, что величина «время на теоретическую тарелку» растет с увеличением  $N$ . Кроме того, согласно этому графику, если для разделения требуется небольшое число теоретических тарелок, то лучше использовать сорбент с малыми частицами, и наоборот, если большое, то предпочтительнее сорбент с крупными частицами. Пунктирные линии, обозначенные «10 с», «100 с» и «1000 с», соответствуют условиям постоянного  $t_0$ . Чтобы определить другие значения  $t_0$ , проводят прямые, параллельные этим линиям. В настоящее время графики Поппе широко используют для сравнения характеристик колонок, поскольку они учитывают и эффективность и проницаемость колонок.

В варианте В допускается изменение длины колонки и размера частиц. Этот вариант полезен, когда надо разработать либо очень быстрое разделение, либо требуется очень большое число тарелок (экстремальные условия разделения). Последние 10 лет говорят о растущей потребности в очень быстрых ВЭЖХ-разделениях продолжительностью минута и даже меньше (раздел 2.5.3.2). С другой стороны, сейчас биохимики столкнулись с проблемой разделения образцов, содержащих тысячи компонентов (раздел 13.4.5). В таких случаях важнее большее число  $N$ . Вне зависимости от того, является ли целью сложного разделения минимальная продолжительность или максимальное число теоретических тарелок, лучше подбирать условия, при которых  $N$  в единицу времени будет максимальным (как на рис. 2.14б). Можно пока-

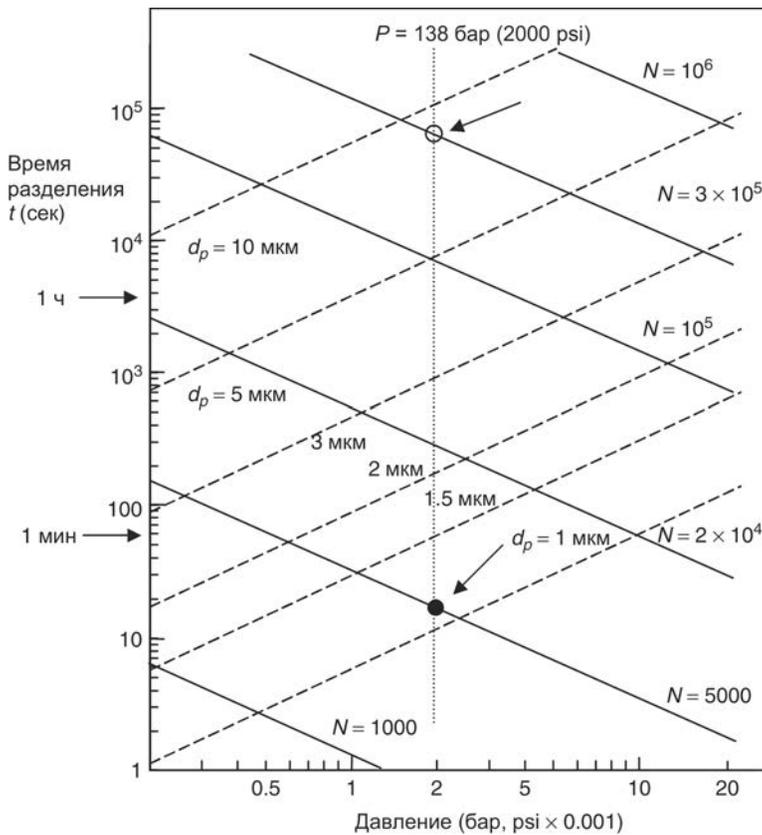


**Рис. 2.14.** Зависимость  $N$  от длины колонки. Для сохранения постоянного давления изменяли скорость потока. (а) зависимость  $N$  от  $t_0$  для частиц сорбента разного размера; (б) «график Поппе» по данным (а). Вычисления проводились по уравнению (2.17) при условии, что  $A = 1$ ,  $B = 2$ ,  $C = 0,05$ , вязкость — 0,6 сП (например, для смеси 60% ацетонитрил-вода, 35 °С),  $D_m = 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с (для образца с молекулярной массой 300 Да), перепад давления на колонке 136 бар (2000 psi)

зять, что выбор оптимальных длины колонки, размера частиц и скорости потока всегда будет соответствовать минимальному значению  $h \approx 2$  (или  $v \approx 3$ ). Поскольку имеющиеся в продаже колонки ограничены в длине и размере частиц, можно только подобрать приблизительные условия для  $v \approx 3$  одновременно с требуемым значением  $N$  за минимальное время анализа. К счастью, увеличение  $v$  в 2–3 раза слабо влияет

на  $h$  или  $N$ , что существенно расширяет возможность выбора размера частиц или колонки желаемого размера. См. также [38a].

График на рис. 2.15 построен по уравнению (2.17) при  $v = 3$  и служит примером, как можно подобрать условия, при которых достигается максимальное  $N$  для определенного времени разделения при некотором заданном максимальном  $P$ . Предположим, максимальное давление составляет 136 бар (2000 psi), а  $k$  последнего пика на хроматограмме равно 3 (для других значений  $k$  нужно подбирать время по рис. 2.15 и уравнению (2.5)). В этих условиях, если требуется  $N = 5000$ , продолжительность анализа может составить 15 секунд (на рисунке обозначено  $\bullet$  и стрелкой), а 300000 теоретических тарелок требуют 17-часового анализа (60000 с, на рисунке обозначено  $\circ$  и стрелкой). В первом случае ( $N = 5000$ ) необходимо использовать частицы размером 1 мкм, во втором ( $N = 300000$ ) — 9 мкм. То есть для быстрых разделений лучше всего использовать колонки с малым размером частиц, если же требуется



**Рис. 2.15.** Зависимость количества теоретических тарелок  $N$  от времени разделения  $t$ , перепада давления на колонке  $P$  и диаметра частиц сорбента  $d_p$ . Сплошными линиями (—) показаны различные значения  $N$ , штриховыми (---) — различный размер частиц, пунктирная линия (⋯⋯) соответствует давлению на колонке 136 бар (2000 psi). Все значения на рисунке указаны для минимальной приведенной высоты теоретической тарелки  $h \approx 2$  и  $k = 3$ . Вязкость 0,6 сП (например, для смеси 60% ацетонитрил-вода, 35 °C) и  $D_m = 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с (относится к образцу с молекулярной массой 300 Да в указанных условиях). По данным из [23]

много теоретических тарелок, то подойдут и крупные частицы, но при этом увеличится время анализа (см. предыдущее обсуждение рисунка 2.14). Увеличение допустимого давления дает возможность либо сократить время анализа (при неизменном  $N$ ), либо увеличить  $N$  (при неизменном времени анализа). В этом можно убедиться, сравнив графики на рис. 2.15 для  $P = 1360$  бар (20000 psi) и  $P = 68$  бар (1000 psi). Повышение допустимого давления способствует использованию малых частиц для более быстрого разделения или большего числа  $N$ . Очень большое количество теоретических тарелок или очень быстрые разделения требуют экстремальных условий, о чем свидетельствует рис. 2.15.

По разным причинам графики, изображенные на рис. 2.11 и 2.13—2.15, носят приблизительный характер, и при варьировании условий, перечисленных в таблице 2.4 (например, вязкости подвижной фазы, молекулярной массы компонентов образца, температуры) они будут изменяться. Поэтому эти графики могут служить прежде всего качественными ориентирами для выбора экспериментальных условий, а не для количественных расчетов какого-то конкретного разделения.

Скорость потока и длину колонки, соответствующие графикам на рис. 2.15, можно определить по уравнению (2.18), учитывая что  $H = L/N$  и  $h = 2$ :

$$L = NH = Nhd_p = 2Nd_p. \quad (2.21)$$

Здесь  $L$  и  $d_p$  выражено в сантиметрах. По уравнению (2.18a) для  $v \approx 3$

$$u = \frac{3D_m}{d_p}, \quad (2.21a)$$

а  $F$  определяют по уравнению:

$$F = \frac{3V_m D_m}{L d_p}, \quad (2.21b)$$

где  $V_m$  — мертвый объем колонки (равный  $t_0 F$ , уравнение (2.7a)). Единицы измерения в уравнении (2.21b) следующие: мл/с ( $F$ ), мл ( $V_m$ ), см<sup>2</sup>/с ( $D_m$ ), см ( $L$ ), см ( $d_p$ ).

### 2.4.2. Форма пика

До сих пор мы предполагали, что на окончательной хроматограмме у нас получатся симметричные пики. В идеальных условиях пик имеет форму кривой Гаусса

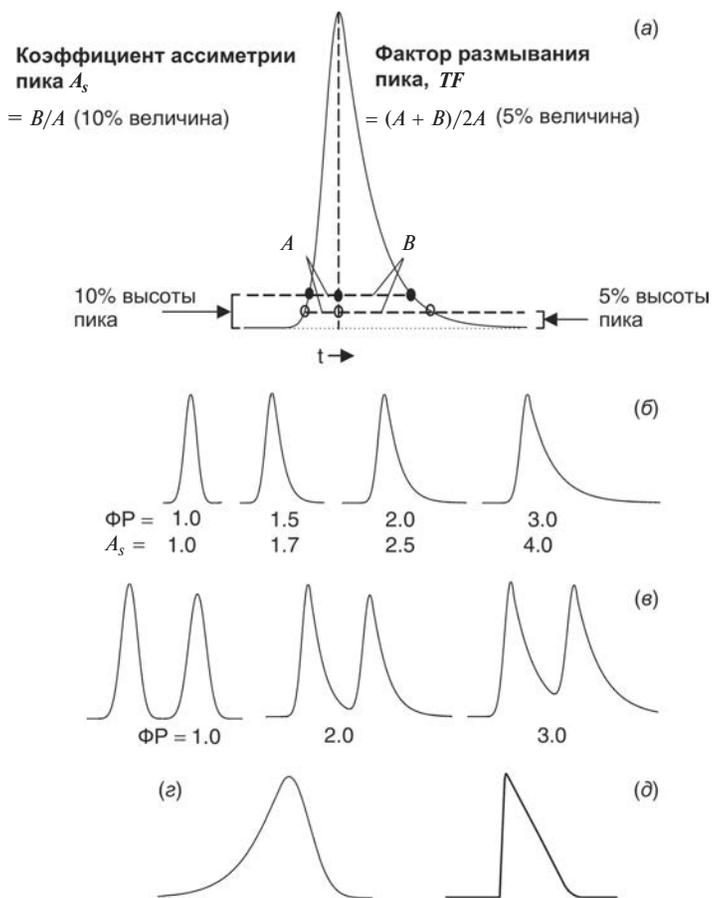
$$y = (2\pi)^{-0,5} e^{-x^2/2}. \quad (2.22)$$

Здесь  $x = (t - t_R)/\sigma$ , где  $t$  — это время,  $y = W/4$ , а  $y$  — это высота пика. Форма настоящих пиков на хроматограмме, как правило, немного отличается от симметричной кривой Гаусса, в большей или меньшей степени пикам свойственно *размывание заднего фронта* (рис. 2.16a). Размывание заднего фронта пика можно охарактеризовать двумя параметрами: *коэффициентом асимметрии*  $A_s$  (на рис. 2.16a показан слева) или *фактором размывания*  $TF$  (*tailing factor*) (на рисунке справа). Величины  $A_s$  и  $TF$  взаимосвязаны следующим образом:

$$A_s = 1 + 1,5(TF - 1), \quad (2.22a)$$

то есть значения  $A_s$ , как правило, немного больше  $TF$  (таблица 2.5).

На рис. 2.16б показано, как в зависимости от значений  $A_s$  и  $TF$  меняется форма пика. У идеально симметричного пика  $A_s = TF = 1,0$ . Влияние размывания на разделение двух соседних пиков продемонстрировано на рис. 2.16в, где изменяется только размывание, охарактеризованное  $TF$ . Два пика с  $A_s = TF = 1,0$  хорошо отделяются друг от друга, но чем больше размывание, тем хуже разделение. Во многих случаях



**Рис. 2.16.** Определение размывания пика и его влияние на разделение. (а) Определение коэффициента асимметрии и фактора размывания ( $A_s$  и  $TF$ ), (б) влияние  $A_s$  и  $TF$  на форму пика, (в) влияние размывания пика на разделение, (г) размывание переднего фронта пика, (д) размывание из-за «перегрузки» (сравните с «экспоненциальным» размыванием на рисунке (а))

**Таблица 2.5.** Соотношение коэффициента асимметрии и фактора размывания заднего фронта пика

Коэффициент асимметрии пика (измеряется на высоте равной 10% высоты пика)	Фактор размывания пика (измеряется на высоте равной 5% высоты пика)
1,0	1,0
1,3	1,2
1,6	1,4
1,9	1,6
2,2	1,8
2,5	2,0

размывание пика ( $TF < 1,2$ ) мало и поэтому им можно пренебречь. Исключением является ситуация, когда сразу же за большим пиком элюируется малый (сравните рис. 2.17г и д). Гораздо реже встречается размывание переднего фронта пика ( $TF < 1,0$ , рис. 2.16г), которое оказывает аналогичное, потенциально отрицательное влияние на разделение. Когда пик подвергается сильному размыванию  $TF > 2$ , это сказывается не только на разделении, но и на количественном анализе, поэтому в рутинных анализах рекомендуется придерживаться общего правила — показатель  $TF$  всех пиков должен быть меньше 2. Количественная оценка по площади пика (глава 11) требует интегрирования всего пика, что, в свою очередь, зависит от задания правильных пределов интегрирования, а это осложняется для пиков с значительной асимметрией.

Если на хроматограмме (неважно, во время рутинного анализа или в процессе разработки метода) появились сильно размытые пики ( $TF \geq 2$ ), то рекомендуется незамедлительно решить эту проблему. Далее будем считать, что у нас симметричные пики, если не оговорено иное. Можно выделить ряд причин, приводящих к неправильной или размытой форме пика:

- «некачественная» колонка (загрязнен фильтр или в колонке между фильтром и сорбентом образовалось пустое пространство, раздел 5.8);
- засорившаяся колонка (накопление на сорбенте сильно удерживаемых примесей, раздел 5.8);
- перегрузка колонки (слишком много образца, раздел 2.6.2);
- образец растворен в слишком полярном растворителе (раздел 2.6.1);
- внеколоночное размывание пика (раздел 2.4.1, 3.9);
- силанольные взаимодействия (включая загрязнение сорбента следовыми количествами металла, раздел 5.4.4.1, 7.3.4.2);
- неправильно выбран буфер или недостаточна его буферная емкость (раздел 7.2.1.1);
- прокачивание холодной подвижной фазы через нагретую колонку (неправильное термостатирование, раздел 2.5.3.1).

См. также раздел 17.4.5.3. Прежде чем решать проблему размывания, надо определить: это экспоненциальное размывание или размывание в результате перегрузки. Экспоненциальное размывание характеризуется постепенным возвращением пика к базовой линии (рис. 2.16а). При перегрузке колонки пик имеет форму прямоугольного треугольника (рис. 2.16д). В последнем случае (рис. 2.16д) уменьшить размывание можно, введя меньшее количество образца. Однако, при экспоненциальном размывании этот способ не решает проблему, а может ее даже усугубить [39, 40]. Вообще размывание пиков желательно сокращать до значения  $TF \leq 1,5$ .

Были предприняты попытки математически описать форму размытого пика разными способами [41, 42] и дать такое определение числа теоретических тарелок  $N$ , которое бы включало негативное влияние размывания на разделение. Значения  $N$  размытых пиков, вычисленные по уравнению (2.9) (и особенно по уравнению (2.9а)), завышают эффективность колонки. Реальная эффективность, которую определяли по фактическому разделению пиков на хроматограмме, говорит о меньшем числе теоретических тарелок. Уравнение Дорси-Фоли широко используется для определения скорректированного значения  $N$  для пиков с размыванием заднего фронта [43]:

$$N = \frac{41,7(t_R / W_{0,1})^2}{(B / A) + 1,25}. \quad (2.226)$$

Параметры  $A$  и  $B$  определяют как показано на рисунке 2.16а (на высоте, равной 10% высоты пика от базовой линии),  $W_{0,1}$  — это величина  $W$ , измеренная на той же высоте.

Существует еще один способ определения скорректированного значения  $N$  для асимметричного пика с помощью так называемого значения  $5\text{-}\sigma$ :

$$N = 25 \left( \frac{t_R}{W_{5\sigma}} \right)^2. \quad (2.22\text{в})$$

Здесь  $W_{5\sigma}$  — ширина пика на высоте, равной 4,5% высоты его максимума. Такой способ вычисления  $N$  похож на вычисление числа теоретических тарелок по ширине пика на его полувысоте (уравнение 2.9а). Чем ближе к базовой линии определяют ширину пика, тем сильнее влияет размывание пика на число теоретических тарелок, т.е.  $W_{1/2}$  (незначительное влияние)  $< W < W_{5\sigma}$  (существенное влияние). Когда в разделениях присутствуют асимметричные пики, уравнения (2.22б) и (2.22в), также как и другие способы [41], могут в лучшем случае дать лишь приблизительную оценку эффективности колонки. При сравнении двух пиков на рисунках 2.16а и е можно видеть, что асимметричные пики нельзя описать одной общей формулой (в отличие от симметричных пиков, для которых есть уравнение (2.22)), и для описания пиков при  $TF > 1,2$  одного значения  $N$  недостаточно. Для характеристики таких пиков рекомендуется использовать  $N$ , вычисленное по уравнению (2.9а), *вместе* со значениями  $A_s$  или  $TF$ . Во многих случаях уширение заднего фронта пика — один из параметров, измеряемых при определении пригодности системы, чтобы отследить ухудшение эффективности колонки. Для этих целей подойдет практически любой метод, который позволит отслеживать изменения формы пика, происходящие со временем.

## 2.5. Разрешение и разработка метода

*Разработка метода* ВЭЖХ предполагает подбор хроматографических условий, обеспечивающих приемлемое разделение данного образца. Более подробная информация (но не такая современная, как в этой книге) дана в работе [44]. Разделение двух пиков  $i$  и  $j$  (рис. 2.10а) обычно описывается их *разрешением*  $R_s$ , которое можно определить по формуле (разность времен удерживания)/(средняя ширина пика) или:

$$R_s = \frac{2[t_{R(j)} - t_{R(i)}]}{W_i + W_j}. \quad (2.23)$$

$W_i$  и  $W_j$  — ширина пиков  $i$  и  $j$ , соответственно, на уровне базовой линии. Чем больше разность времен удерживания пиков и/или уже пики, тем лучше разделение (больше разрешение). Для проведения точного количественного анализа разделений, подобных представленным на рис. 2.17а, предпочтительно иметь *разрешение пиков до базовой линии*, т.е. впадина между двумя пиками должна находиться на уровне базовой линии. Два пика примерно одинакового размера будут иметь разрешение до базовой линии (рис. 2.17а) при  $R_s > 1,5$ . В препаративной хроматографии (раздел 15.3.2) разрешение до базовой линии позволяет полностью выделить каждый пик со 100%-ной чистотой.

На рис. 2.17 изображены примеры различного разрешения ( $R_s = 1,0, 1,5, 2,0$ ) при разном соотношении размеров пиков (1:1, 10:1, 100:1, 1000:1). Когда разрешение двух симметричных пиков ( $TF=1,0$ ) больше 1,5, то видно, что перекрывание достаточно мало вне зависимости от их относительных размеров. Небольшое размывание заднего фронта пика ( $TF = 1,2$ , рис. 2.17д) может приводить к значительной потере разрешения, если следом за крупным пиком элюируется малый пик. В этом случае нужно подбирать условия, чтоб разрешение было больше двух. С практической точки зрения уменьшить размывание пика до  $TF \approx 1,0$  очень сложно. Следовательно, если

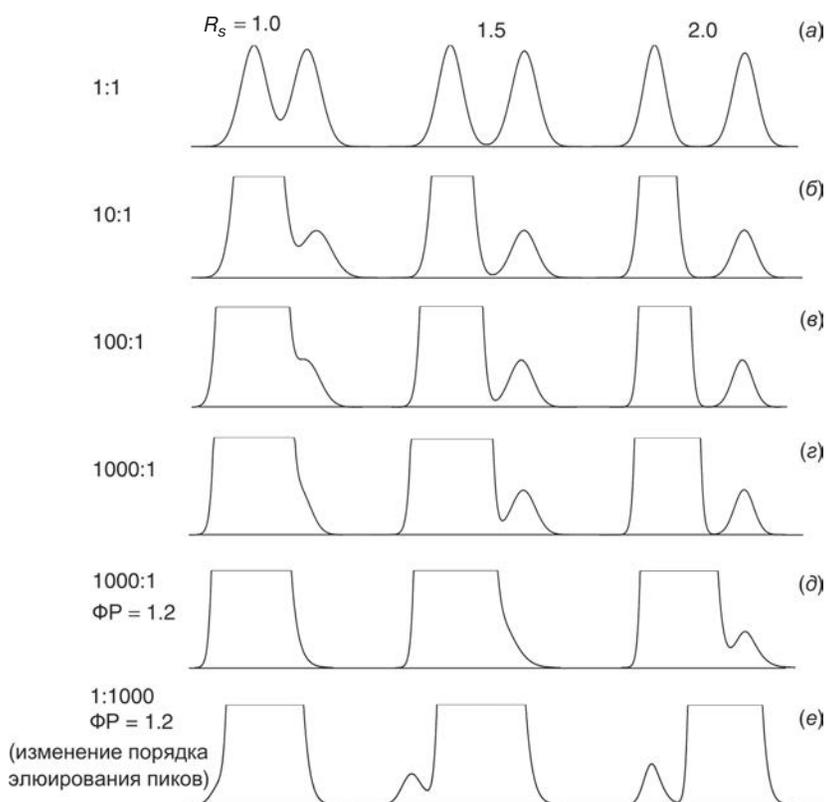


Рис. 2.17. Зависимость разделения от разрешения при различных относительных размерах пиков (1:1, 10:1 и т.д.), и размывании заднего фронта пика (д, е)

концентрация примеси в образце низкая относительно ближайшего основного пика, то желательно, если вообще возможно, чтобы первым элюировался пик примеси, а *после* него шел целевой пик. Это необходимо сделать для того, чтобы минимизировать влияние размывания заднего фронта пика на разрешение (сравните рис. 2.17д и е). Изменить порядок элюирования пиков, т.е. сделать так, чтобы первым выходил небольшой пик, а потом уже большой, иногда можно в процессе разработки метода разделения, варьируя условия, влияющие на селективность (раздел 2.5.2).

Обычно при разработке ВЭЖХ-метода стоит задача отделить каждый интересующий нас пик от соседних до базовой линии ( $R_s \geq 2$ ) с коэффициентом запаса, равным  $1/3$  (а не задача разделения до базовой линии пиков примерно одинакового размера с  $R_s \approx 1,5$ ). Подбор условий для получения  $R_s \geq 2$  проводится для того, чтобы компенсировать незначительное размывание фронта пика, умеренное отличие пиков по размеру и обычное медленное ухудшение эффективности колонки, которое также приводит к размыванию и уширению пиков. В некоторых случаях может потребоваться даже большее значение  $R_s$ . В разделах 2.5.1 и 2.5.3 даны рекомендации по улучшению  $R_s$ .

Когда требуется разделить больше двух пиков, подбирают такие условия, в которых разрешение наименее разделяющейся пары пиков было бы не менее двух. Такая пара пиков называется *критической*, а их разрешение — *критическим разрешением*

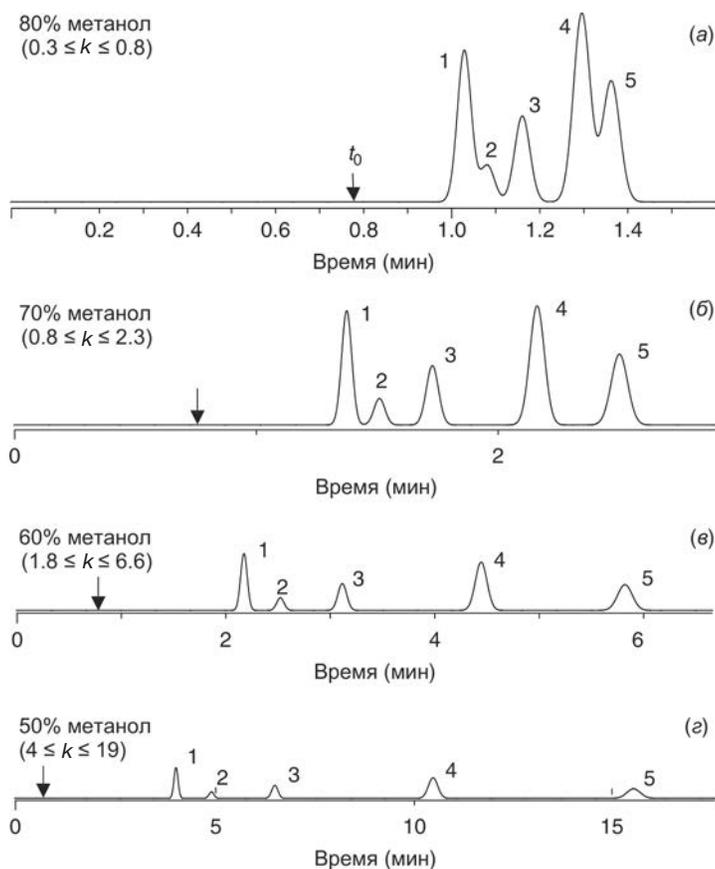
разделения. Примером могут служить соседние пики 1 и 2 с разрешением  $R_s = 0,8$  (рис. 2.18а) или пики с разрешением  $R_s = 3,9$  (рис. 2.18з). Разрабатывая метод, стараются, чтобы разрешение критической пары пиков было приемлемым. Это значит, что разделение остальных пиков также будет удовлетворительным с  $R_s \geq 2$ . В этой книге *при упоминании разрешения  $R_s$  имеется в виду разрешение критической пары пиков* (если не оговорено иное).

При разработке метода удобно использовать другое, приближенное выражение для разрешения, полученное из уравнений (2.5а) и (2.10а) (при условии равенства ширины двух пиков):

$$R_s = \left( \frac{1}{4} \right) \left[ \frac{k}{(1+k)} \right] (\alpha - 1) N^{0,5}. \quad (2.24)$$

(а)      (б)      (в)

Из уравнения видно, что разрешение зависит от удерживания  $k$  первого пика  $i$  (член а), коэффициента селективности  $\alpha$  (член б) и эффективности колонки или



**Рис. 2.18.** Зависимость разделения от доли растворителя В в подвижной фазе. Образец — смесь гербицидов: 1 — монолинурон, 2 — метобромурон, 3 — диурон, 4 — пропазин, 5 — хлорксурон. Условия: колонка  $C_{18}$   $150 \times 4,6$  мм, 5 мкм, подвижная фаза метанол — вода, скорость потока 2,0 мл/мин, комнатная температура. Хроматограмма смоделирована по данным работы [7]

числа теоретических тарелок  $N$  (член  $v$ ). Коэффициент селективности  $\alpha$  (его еще называют *селективностью* разделения или относительным удерживанием) можно вычислить по формуле:

$$\alpha = \frac{k_j}{k_i}. \quad (2.24a)$$

Значения  $k_i$  и  $k_j$  — это удерживание  $k$  соседних пиков  $i$  и  $j$  (рис. 2.10а). Для этого разделения  $k \equiv k_1 = 1,55$ ,  $\alpha = 1,12$ ,  $N = 11000$ , следовательно,  $R_s = (1/4)[1,55/2,55] \times (1,12 - 1)11000^{0,5} = 1,9$ . На основании уравнения (2.24) можно сделать вывод: разрешение можно улучшить изменяя  $k$ ,  $\alpha$  или  $N$ , *однако наиболее эффективно улучшение селективности разделения (параметр  $\alpha$ )*.

Хотя уравнение (2.24) дает не такие точные результаты, как уравнение (2.23), все же оно более полезно в процессе разработки метода. Все численные значения  $R_s$  в этой книге всегда определяли по уравнению (2.23). Уравнение (2.24) необходимо, главным образом, для понимания того, как разрешение зависит от экспериментальных условий, а также в качестве инструкции по системной разработке метода. Разрешение  $R_s$  можно также выразить следующим образом:

$$R_s = \frac{1}{4} \left[ \frac{k}{(1+k)} \right] \left[ \frac{\alpha-1}{\alpha} \right] N^{0,5}. \quad (2.25)$$

Производные формулы (2.24) и (2.25) получены при разной аппроксимации ширины двух пиков. Вычисленные по обоим уравнениям значения  $R_s$  одинаково точны. Единственное преимущество уравнения (2.24) — простота в использовании при разработке метода.

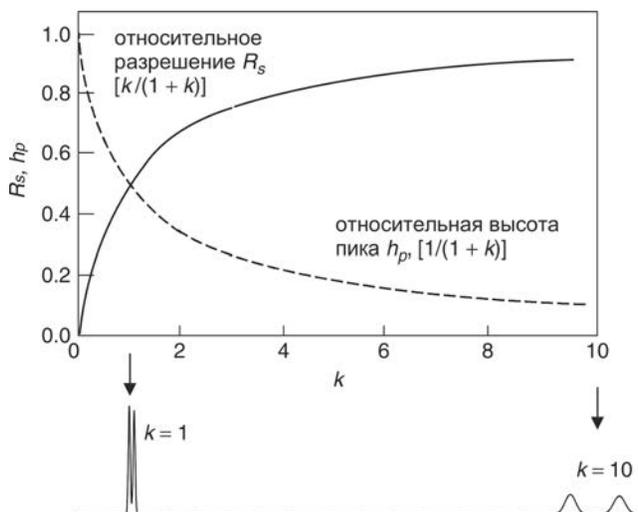
Разработка изократического ВЭЖХ-метода разделения заключается в пошаговом изменении («оптимизации») экспериментальных условий до тех пор, пока разделение не станет приемлемым с критическим разрешением, желательно, больше двух. В разделах 2.5.1—2.5.3 показано, что уравнение (2.24) служит удобным руководством по разработке изократического метода. Каждый из членов  $a$ - $v$  уравнения (2.24) можно контролировать, изменяя определенные условия разделения (табл. 2.2). Обычно сначала выбирают колонку с достаточным числом теоретических тарелок, способную разделить образец указанной сложности. В большинстве случаев лучше начинать с  $N \approx 10000$ . Такой эффективностью обладают колонки длиной 150 мм, упакованные частицами 5 мкм, либо колонки длиной 100 мм с 3 мкм частицами. Затем подбирают долю растворителя  $V$  в подвижной фазе. Она должна быть такой, чтобы коэффициент удерживания укладывался в соответствующий интервал (например,  $1 \leq k \leq 10$ ), после чего оптимизируют  $\alpha$ . На последнем этапе корректируют число теоретических тарелок колонки, пытаясь найти компромисс между несовместимыми параметрами: приемлемым разрешением и небольшим временем анализа.

Финальные условия разделения вряд ли можно назвать действительно оптимальными, но они лучшие из возможных. Тем не менее в литературе часто встречается термин «оптимизированный», который означает относительно улучшенные или рекомендуемые условия, но не абсолютно идеальные. Кроме того, следует отметить разницу между «локальной» и «глобальной» оптимизациями. Локальная оптимизация — это улучшение одного или двух (редко больше) условий разделения в ограниченном интервале значений каждого из этих условий. При этом все остальные условия, обычно не оптимальные, такими же и остаются. Глобальная оптимизация предполагает подбор всех условий, от которых зависит разделение. Когда говорят об «оптимизированной» методике, в большинстве случаев имеют в виду улучшенное разделение или локальный оптимум. Будем и далее в этой книге придерживаться этой формулировки: «оптимум» не есть синоним глобально лучшего разрешения.

### 2.5.1. Оптимизация фактора удерживания $k$ (член $a$ в уравнении (2.24))

В изократических методах удерживание вещества обычно контролируют путем изменения доли растворителя  $V$  в подвижной фазе (%В). На первом этапе подбирают такое значение  $k$ , которое было бы не слишком большим, но и не слишком малым. Зависимости относительных значений разрешения  $R_s$  (уравнение 2.24) и высоты пика (уравнение 2.11) от коэффициента удерживания изображены на рис. 2.19, чтобы показать, как они влияют на  $k$  (предполагается, что  $k$  не влияет на  $\alpha$ ). В нижней части рис. 2.19 наглядно представлено как меняется разрешение и высота пиков при изменении %В в интервале значений  $k$  от 1 до 10.

Как правило, стремятся к тому, чтобы удерживание всех пиков на хроматограмме было  $\leq 10$ , т.к. это условие соответствует более высоким и узким пикам, что улучшает их детектирование, а также приводит к уменьшению времени анализа, следовательно, в день можно анализировать больше образцов. Значения  $k \ll 1$  могут приводить к плохому разрешению, особенно из-за возможного наложения зон анализируемых веществ на зоны скапливающихся в области  $t_0$  компонентов матрицы (см. «мусорный» пик на рис. 2.5б). Следовательно, после завершения разработки разделения, в окончательной методике времена удерживания всех пиков должны находиться в интервале  $1 \leq k \leq 10$ . Впрочем, по выбору хроматографиста этот интервал значений  $k$  можно несколько расширить, например, от 0,5 до 20. С другой стороны, органы контроля могут рекомендовать значение  $k$  не менее двух для всех целевых пиков на хроматограмме [46], чтобы уменьшить влияние вспомогательных веществ или других неустановленных пиков («мусор»), элюируемых с колонки вблизи  $t_0$ . Если для детектирования используется масс-спектрометр (ЖХ-МС), то из-за возможных эффектов подавления ионов подбирают  $k \geq 3$ . Когда понятно, что все интересующие нас пики не помещаются в некоторый максимальный интервал (т.е.  $0,5 \leq k \leq 20$ ), переходят к градиентному элюированию (раздел 2.7.2, глава 9).



**Рис. 2.19.** Зависимость относительного разрешения  $R_s$  и относительной высоты пика  $h_p$  от  $k$  или продолжительности анализа. Продолжительность анализа пропорциональна величине  $(1+k)$  для последнего пика. Значение  $\alpha$  предполагается постоянным

На рис. 2.18 показано, как изменение доли органического растворителя в подвижной фазе влияет на обращенно-фазовое разделение. При 80% метанола в воде (80 %В) значения  $k$  слишком малы:  $0,3 \leq k \leq 0,8$  и, как следствие, разрешение низкое (рис. 2.18а). Снижение доли растворителя В до 50% (рис. 2.18г,  $4 \leq k \leq 19$ ) приводит к очень хорошему разрешению ( $R_s = 3,9$ ), но время разделения слишком велико, и последние пики становятся широкими и низкими, что понижает чувствительность детектирования. К разумному компромиссу между разрешением ( $R_s = 2,6$ ), чувствительностью детектирования и продолжительностью анализа (6 минут), удается прийти, установив промежуточное значение В (60%, рис. 2.18б). При этом и удерживание укладывается в приемлемый диапазон  $1,8 \leq k \leq 6,6$ . Подвижная фаза, содержащая 60–70 %В, возможно, будет даже лучше, так как достигается разрешение  $R_s > 2,0$ , затрачивается еще меньше времени на анализ и ещё повышается чувствительность.

В ОФХ удерживание зависит от доли органического растворителя (как показано на рис. 2.18) и эта зависимость описывается эмпирическим уравнением [47]

$$\log k = \log k_w - S\varphi, \quad (2.26)$$

где  $\varphi$  — объемная доля растворителя В (равная  $0,01 \times \%В$ ),  $k_w$  — экстраполированное значение  $k$  соединения  $X$  в подвижной фазе, состоящей из чистой воды, т.е. при  $\varphi = 0$ , а  $S$  — константа для соединения  $X$ , когда изменяется только  $\varphi$ . Вывод уравнения (2.26) приведен в работе [48]. Для «малых» молекул с молекулярным весом 100–500 Да константа  $S \approx 4$  [49], поэтому увеличение  $\varphi$  на 0,1, т.е. изменение подвижной фазы на +10 %В, приведет к среднему уменьшению  $k$  всех пиков в образце примерно в  $10^{(0,1 \times 4)}$  раз или в 2,5 раза. Поэтому уравнение (2.26) подразумевает последовательный порядок действий, в ходе которых осуществляется поиск удовлетворительного %В — такого, чтобы  $k$  находился в диапазоне от 1 до 10 (или в любом другом желательном интервале).

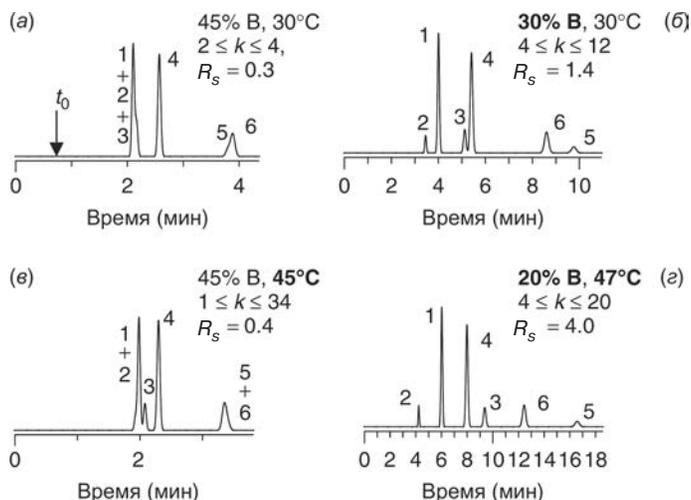
В соответствии с этим порядком действий первое разделение выполняется с 80% или 90 %В. Такое высокое содержание органического растворителя в подвижной фазе гарантирует полное элюирование всего образца с колонки за короткое время. Например, в первом эксперименте с 80 %В (рис. 2.18а) был получен интервал удерживания  $0,3 \leq k \leq 0,8$ . Применив правило 2,5-кратного увеличения  $k$  при снижении на каждые 10 %В, можно оценить  $k$  для меньших долей растворителя В: для 70%  $2,5 \times 0,3 \approx 0,8$  ( $k$  первого пика),  $2,5 \times 0,8 \approx 2,0$  ( $k$  последнего пика), т.е.  $0,8 \leq k \leq 2,0$ . Аналогично рассчитываем для 60 %В и получаем  $2,0 \leq k \leq 5$ . Этот интервал вполне соответствует требуемому  $1,0 \leq k \leq 10$  (как и наблюдаемый  $1,8 \leq k \leq 6,6$ ). Поэтому в качестве подвижной фазы во втором эксперименте по разработке метода лучше использовать 60 %В (остальные условия разделения остаются неизменными).

Для образца, содержащего соединения, удерживающиеся слабее, чем представленные на рис. 2.18, начальное элюирование 80 %В, приведет к тому, что все пики на хроматограмме будут иметь  $k \approx 0$  (т.е. все вещества в образце выйдут в одном пике). Чтобы подобрать приемлемые значения  $k$ , необходимо существенно сократить долю органического растворителя по крайней мере на 30%. Поэтому второй эксперимент целесообразно проводить с  $(80 \%В - 30 \%В) = 50 \%В$ . Затем, как в приведенном выше примере (рис. 2.18), следует изменять %В до тех пор, пока  $1 \leq k \leq 10$ . Поскольку «правило 2,5» носит приблизительный характер, то между экспериментами нежелательно изменять %В более чем на 30%, иначе при маленькой доле органического растворителя можно упустить поздноэлюируемые пики. Существует и другой способ подбора %В (обычно предпочитают его): разрабатывая методику, первый эксперимент проводят в градиентном режиме (раздел 9.3.1).

### 2.5.2. Оптимизация селективности $\alpha$ (член б в уравнении (2.24))

Если и дальше требуется улучшение разделения, то следующим шагом является регулирование относительного удерживания (расстояние между пиками на хроматограмме, селективность или коэффициент селективности  $\alpha$ ) путем изменения любого из первых семи параметров таблицы 2.2: %В, растворитель В (обычно метанол или ацетонитрил), температура, тип колонки или — если в образце есть кислоты или основания — рН, концентрация буфера, концентрация ион-парного агента. Заметим, что любое изменение каждого из параметров таблицы 2.2 влияет на значение  $k$ , поэтому необходимо одновременно корректировать %В, чтобы коэффициент удерживания оставался в допустимом диапазоне (как правило, не более  $0,5 \leq k \leq 20$ ).

На рис. 2.20 показано изменение селективности при разделении образца, содержащего 6 соединений. Первоначально %В был подобран так, чтобы коэффициент удерживания находился в интервале  $2 \leq k \leq 4$  (рис. 2.20а). Для улучшения селективности и разрешения будем далее изменять %В и температуру. В условиях 45 %В и  $T = 30^\circ\text{C}$  (рис. 2.20а) пики 1-3 и 5/6 плохо разрешены ( $R_s = 0,3$ ). Снижение доли органического растворителя в элюенте до 30% (рис. 2.20б) положительно отразилось на разделении всех 6 пиков с подходящим интервалом удерживания ( $4 \leq k \leq 12$ ), но разрешение пиков 3 и 4 стало предельно допустимым, в то время как в первом эксперименте (рис. 2.20а) они разделились хорошо. Кроме того, при 30 %В (рис. 2.20б) пики 5 и 6 поменялись местами. По этим двум хроматограммам можно сделать вывод: промежуточная доля растворителя В, вероятно, улучшит разрешение, т.е. увеличится расстояние между пиками 3 и 4, а пики 1/2 и 5/6 не слишком сбли-



**Рис. 2.20.** Влияние доли органического растворителя в подвижной фазе и/или температуры на изократическое разделение шестикомпонентного образца. Образец: 1 — 3-фенилпропанол, 2 — 1-нитропропан, 3 — оксазепам, 4 — *n*-хлорфенол, 5 — эвгенол, 6 — метилбензоат. Условия: колонка  $C_{18}$  150 × 4,6 мм, 5 мкм, подвижная фаза ацетонитрил — вода, скорость потока 2,0 мл/мин; на рисунках указана температура и %В (изменения выделены жирным шрифтом). Обратите внимание, на всех хроматограммах высоты пиков нормализованы по отношению к самому высокому пику. Хроматограммы смоделированы по работам [50, 51]

зятся. На самом деле подвижная фаза с 33 %В и температура 30 °С значительно улучшают разрешение ( $R_s = 2,1$ , хроматограмма не показана).

Если не менять состав подвижной фазы (оставить такой как на рисунке 2.20а), но увеличить температуру с 30 до 45 °С (рис. 2.20в), относительное удерживание (или селективность) изменятся, но в целом разделение останется неприемлемым ( $R_s = 0,4$ ). Можно путем проб и ошибок найти подходящие %В и температуру и определить максимальное разрешение. Оно будет составлять  $R_s = 4,0$  при 20 %В и 47 °С (рис. 2.20в), но значение  $k$  при этом достигнет 20. Целью повышения селективности является либо увеличение разрешения или сокращение продолжительности анализа, либо одновременное изменение обоих параметров. При выборе условий приемлемого разделения (например, во время разработки метода) следует отдать предпочтение изменению селективности, поскольку она одновременно влияет и на разрешение, и на продолжительность анализа. Это в первую очередь справедливо для трудноразделимых образцов с большим количеством компонентов (когда на хроматограмме наблюдается очень много пиков) или с компонентами, чьи времена удерживания очень близки (например, изомеры).

### 2.5.2.1. «Правильные» и «неправильные» образцы

*Настоящий раздел поможет понять как и почему меняется разделение в зависимости от %В, особенно в градиентном режиме. Тем не менее, этот материал не так важен в повседневной работе или при разработке методов разделения в ОФХ. Поэтому его можно пропустить, перейти к разделу 2.5.3, а сюда вернуться, если возникнет необходимость.*

В обращенно-фазовых разделениях образцы можно поделить на «правильные» или «неправильные» [52]. При изменении только лишь %В хроматограмма «правильных» образцов как аккордеон, либо сжимается, либо растягивается с минимальным изменением относительного удерживания пиков на хроматограмме. Хороший пример «правильного» образца (смесь гербицидов) дан на рис. 2.18, а на рис. 2.20 изображено разделение «неправильного» образца. Об этом говорит инверсия пиков 5 и 6 при изменении %В (сравните рис. 2.20б и 2.20а), а также небольшое изменение в относительном удерживании пиков 1 и 4. Относительное удерживание (или селективность) «неправильного» образца зависит от %В, «правильного» — нет. Пики «неправильного» образца отслеживать сложнее из-за возможного изменения порядка элюирования и ошибочного распознавания пиков (раздел 2.6.4).

Обычно компоненты «правильных» образцов имеют родственную структуру, тогда как «неправильные» образцы, такие как на рисунке 2.20, являются смесями соединений различной структуры. Тем не менее, очень сложно заранее сказать какой образец «правильный», а какой «неправильный». Более или менее точный ответ дают эксперименты с разной долей растворителя В в элюенте (рис. 2.18). Кроме того, можно по уравнению (2.26) определить, к какой группе отнести образец. У правильных образцов наблюдается сильная корреляция между значениями  $S$  и  $\log k_w$  (например, графики зависимости этих величин смещены друг относительно друга и практически параллельны), в то время как у неправильных образцов такая корреляция не наблюдается (т.е. графики зависимости  $S$  от  $\log k_w$  пересекаются). Многие образцы демонстрируют промежуточное поведение (среднее между тем, что изображено на рис. 2.18 и 2.20), у них менее выражены изменения в относительном удерживании при разном %В. Более подробно правильные и неправильные образцы еще раз обсудим в разделе 6.3.1 (изократическое элюирование) и разделе 9.2.3 (градиентное элюирование).