

Содержание

Часть 1	6
Курс 1. Правильная эксплуатация обращенно-фазовых колонок	6
Курс 2. Работа с буферными растворами в ВЭЖХ ...	21
Курс 3. Состав подвижных фаз в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Особенности ион-парной обращенно-фазовой хроматографии	30
Часть 2	44
Курс 4. Вопросы, наиболее часто задаваемые специалисту по методической поддержке	44
Курс 5. Вопросы, наиболее часто задаваемые специалисту по технической поддержке. Устранение простых неполадок ВЭЖХ оборудования	71
Часть 3	95
Курс 6. Неподвижные фазы для ВЭЖХ: основы. Общий принцип выбора неподвижных фаз	95
Курс 7. ВЭЖХ колонка как промышленный продукт. Качество колонки	103
Курс 8. Неподвижные фазы для обращенно-фазовой ВЭЖХ	114



Часть 4	128
Курс 9. Стандартные ошибки, допускаемые при работе с ВЭЖХ оборудованием	128
Курс 10. Полезные подсказки для тех, кто хочет работать эффективно и с удобством.....	139
Курс 11. Курьезы в ВЭЖХ. Организационные и неклассифицируемые ошибки	148

Константин Сергеевич Сычев начал профессиональную карьеру как химик-аналитик в 1998 г., в 2001 г. окончил химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, в 2004 г. получил степень кандидата химических наук по специальности «хроматография и хроматографические приборы» под руководством В.А. Даванкова (изобретателя хиральной ВЭЖХ, лауреата золотой медали Мартина и медали Нернста – Цвета).

Направления научной работы (2001–2004 гг.): исследование механизмов удерживания и изучение новых адсорбционных материалов для ВЭЖХ и ТФЭ. Основные достижения — разработка методологии численного выделения индивидуальных механизмов удерживания из данных по удерживанию в смешанных режимах, а также первое прямое доказательство связи между удерживанием в режиме с переносом заряда и характеристиками пи-систем адсорбатов.

С 2004 г. продолжил профессиональную карьеру как разработчик прикладных аналитических методик с применением ВЭЖХ и ТФЭ. В 2008 г. основал компанию «СКАН» (ИП Сычев К.С.), специализирующуюся на разработке коммерческих ВЭЖХ методик. В 2011 г. компания запустила проект авторских ВЭЖХ курсов по различным программам, которые пользуются большим успехом и в настоящее время.

В 2017 г. основал компанию Integrated BioSeparation Solutions (Эстония), специализирующуюся на разработке ВЭЖХ методик, проведении ВЭЖХ исследований, поставке и обслуживании ВЭЖХ систем с предустановленными ВЭЖХ методиками — фармакопейными и собственной разработки.

С 1998 по 2020 гг. опубликовал более 50 статей в российских и международных реферируемых журналах, стал автором пять книг по ВЭЖХ и подготовке пробы. Авторские ВЭЖХ-курсы прослушали более 500 специалистов из более чем 60 компаний.

В ближайших планах — развитие брендовой линейки OEM колонок для ВЭЖХ, запуск новых линеек специализированных ВЭЖХ комплексов, работа над новой книгой «Применение ВЭЖХ для решения задач фармацевтической, пищевой и аграрной индустрий» и запуск авторских курсов на английском языке.

Часть I

Курс I. Правильная эксплуатация обращенно-фазовых колонок

- *Тема эксплуатации обращенно-фазовых колонок всегда вызывает наибольшее количество вопросов. В чем здесь дело?*
- Дело здесь не в самой обращенно-фазовой хроматографии, а в массовости ее применения. Кроме того, другие виды хроматографии, как правило, применяют уже достаточно опытные специалисты, а среди пользователей обращенно-фазовой ВЭЖХ много новичков. Что, конечно же, замечательно, но им требуется определенная помощь.
- *Хорошо. Начнем с простого вопроса: **как начинают работу с новой обращенно-фазовой колонкой?***
- Надо посмотреть на ее сертификат. Понять, силикагельная ли это колонка, или полимерная, или на какой-либо иной основе. Если что, не поленитесь открыть описание этой колонки на сайте производителя.

Если колонка полимерная, то у нее есть ограничение по давлению порядка 150 бар. Сразу выставьте максимальное давление в настройках насоса, иначе потом забудете.

Как правило, новые обращенно-фазовые колонки заполнены либо метанолом, либо смесью ацетонитрил – вода. Уточните это. Есть третий вариант: колонка поставлена сухой, т. е. незаполненной жидкостью. В принципе, это не очень хорошо. Это значит, что колонка довольно долго лежала на складе. Для силикагельных колонок это не очень принципиально — высушивание колонки не приводит к потере ее

эффективности. А вот для полимерных колонок высушивание может быть критичным фактором.

Дальше начинается начальная промывка колонки. Не путайте промывку и кондиционирование.

– *А чем промывка отличается от кондиционирования?*

– Колонку промывают либо для ее очистки от остаточного загрязнения, либо для замены текущего растворителя на какой-либо другой. Как правило, промывка производится до момента полного удаления из колонки остатков компонентов предыдущей подвижной фазы.

А кондиционирование колонки — это, по сути, выдерживание колонки в новой подвижной фазе до момента установления адсорбционного равновесия в системе, т. е. до стабилизации адсорбционных свойств неподвижной фазы — удерживания и селективности. Проводить анализ можно только после завершения кондиционирования колонки.

В этом смысле промывка и кондиционирование — это не только не синонимы, а даже противоположные вещи: по идее, любая промывка любым растворителем, кроме подвижной фазы, нарушает адсорбционное равновесие, что влечет за собой необходимость заново кондиционировать колонку.

– *Хорошо, теперь все понятно. Итак, как проводить первоначальную промывку обращенно-фазовой колонки?*

– Приготовьте подвижную фазу ацетонитрил – вода 1:1. Ацетонитрил должен быть марки «для хроматографии», т. е. пригодным для работы на длине волны 200 нм.

Если к прибору в комплекте идет УФ детектор любого типа, то заранее подготовьте его к работе. На детекторе установите короткую длину волны, к примеру 210 нм. Заполните его кювету подвижной фазой ацетонитрил – вода 1:1, которой будет промываться колонка.

- *Как это делается?*

- Не ставьте колонку на прибор сразу, а сначала соедините инжектор и детектор обычным капилляром диаметра порядка 150 мкм и более. Для этого на оба конца капилляра надевают самые простые пластиковые фитинги и муфты (на английском — юнионы). Включите поток, и кювета детектора заполнится напрямую подвижной фазой. Затем нажмите Auto Zero, чтобы детектор принял за ноль поглощение чистой подвижной фазы. Остановите поток.

- *Хорошо. Дальше.*

- Уберите капилляр, установите вместо него хроматографическую колонку. Запустите насос. Теперь не нажимайте на Auto Zero, т. е. не сбрасывайте показания детектора, а наблюдайте за ними.

Установите объемную скорость потока, которая указана в сертификате колонки в условиях проведения ее теста. Промывайте колонку минут десять до стабилизации давления (допустим, плюс-минус две-три атмосферы). Если колонка оказалось сухой, промывайте до тех пор, пока из колонки перестанут выходить видимые глазом пузырьки (для наблюдения за ними на сливе необходимо установить прозрачный тефлоновый капилляр).

Если высота фона (т. е. показания детектора) через некоторое время после запуска потока (к примеру 15–20 минут) оказывается не выше 50 mAU (mV), значит, колонка более-менее чистая. Дождитесь дрейфа менее 1–2 mAU (mV) в минуту, и начальную промывку можно считать законченной.

Далее переходите к тестированию колонки при помощи того или иного теста. Приготовьте подвижную фазу, проведите кондиционирование, проведите тестовый анализ, за-

пишите результаты тестирования в журнал. Теперь обращенно-фазовая колонка готова к работе.

– **Какого объема подвижной фазы достаточно для кондиционирования новой обращенно-фазовой колонки?**

- Для начала не следует путать кондиционирование колонки и ее промывку. Выше мы рассмотрели простой способ промывки обращенно-фазовой колонки, и он достаточно универсален.

А универсального рецепта кондиционирования колонки не существует, поскольку кондиционирование — это подготовка колонки к проведению совершенно конкретного разделения в определенных условиях. Проводится она пропуском подвижной фазы через колонку.

Колонка считается откондиционированной тогда, когда удержание всех целевых компонентов становится стабильным. Вам интересно узнать, какой объем подвижной фазы необходимо пропустить через колонку чтобы удержание стабилизировалось?

- Да.

- Дело не в объеме пропускаемой подвижной фазы, а во времени кондиционирования. От объема пропускаемого через колонку растворителя зависит результат промывки. А при кондиционировании все определяет время, а не объем. Поэтому, если колонка надлежащим образом промыта и заполнена применяемой подвижной фазой, не имеет смысла включать слишком высокую скорость потока.

- *Хорошо, тогда какое время необходимо кондиционировать новую обращенно-фазовую колонку?*

- Вот это уже более корректно поставленный вопрос. В общем случае ответ такой: время кондиционирования определяется временем установления адсорбционного равновесия в хроматографической системе.

В «классической» обращенно-фазовой хроматографии на «стандартных» C18 и C8 фазах с неполярным энд-кеппингом равновесие устанавливается очень быстро, поэтому на кондиционирование таких фаз может уходить 10–15 минут, не более. Поэтому, кстати, именно эти колонки можно спокойно промывать. И именно поэтому на них хорошо и воспроизводимо получают градиентные разделения.

- *Мы коснемся этих вопросов отдельно?*
- Да, и по градиенту, и по необходимости промывок — обсудим все.
- *Хорошо, дальше.*
- Дальше начинаются некоторые сложности. Для обращенных фаз с полярным энд-кеппингом или же с более полярными, чем C18 и C8, прививками (например для C16-амидных фаз) время кондиционирования может составлять от получаса до нескольких часов.

Происходит это по той причине, что адсорбент теперь содержит, кроме неполярных, еще и полярные группы; следовательно, на нем организуется некоторый адсорбционный слой, который существует в равновесии с подвижной фазой.

- *И чем более полярна неподвижная фаза, тем дольше она приходит в равновесие с подвижной?*
- Совершенно верно. Еще это зависит от целевых соединений. Соединения, содержащие в своей структуре гидрофильные нейтральные либо ионные фрагменты (например гликозиды, полярные метаболиты фармацевтиков), более чувствительны к адсорбционному равновесию, поэтому кондиционирование длится дольше.

Вообще, при применении C16-амидных и подобных им фаз я настоятельно рекомендую применять солевые бу-

феры достаточно высокой концентрации (до 50 мМ). Это помогает стабилизировать разделение и уменьшить продолжительность кондиционирования.

В любом случае применение обращенно-фазовых колонок с полярными группами накладывает некоторые ограничения на возможность их промывки — ведь после промывки их надо заново кондиционировать, т. е. тратить от получаса и более.

- *Есть ли случаи, когда кондиционирование обращенных фаз занимает еще больше времени?*
- Да, когда разделение ведется в ион-парном режиме. Там кондиционирование может длиться от нескольких часов до нескольких дней. Но ион-парные режимы мы обсудим отдельно.
- *Хорошо. Вот вопрос в продолжение темы промывок: **чем промывать обращенно-фазовые колонки?***
- Для начала я хочу предостеречь от тяги промывать колонку по любому поводу, а также совсем без повода. Помните, что всякого рода промывки (особенно скачанные с разных «умных» сайтов) могут убить колонку значительно быстрее, чем планомерная работа с одной подвижной фазой. Особенно в том случае, когда пользователь сам не совсем понимает, что он делает и что хочет этой промывкой достичь.
- *Бывает такое, что промывают колонку без повода?*
- Конечно. Например, что-то в разделении не получается и, поскольку непонятно, что делать, промывают колонку просто «на всякий случай».

Кроме того, в ВЭЖХ полно мифов, и один из них утверждает, что паразитные (лишние) пики возникают оттого, что что-то «застряло в колонке». И вместо того чтобы искать причину в загрязненной пробе или загрязненном ин-

жекторе (включая шприц), начинают интенсивно промывать колонку. Которая вообще здесь ни при чем.

- *Но есть же реальные случаи, когда колонку нужно промыть от веществ, оставшихся в ней после проведения изократического разделения?*
- А это уже недостатки методики, которую плохо разработали. В обращенно-фазовой хроматографии для подобных разделений можно предусмотреть автоматическую промывку колонки более сильной подвижной фазой с последующим кондиционированием применяемой подвижной фазой. Все программируется на втором насосе, как будто это градиентное элюирование.
- *То есть для промывки нужно использовать подвижную фазу с большим содержанием ацетонитрила?*
- Да. Но если применяемая подвижная фаза содержит соли, то лучше промывать колонку просто смесью ацетонитрила и воды — во избежание выпадения соли в осадок. При этом ацетонитрила берут на 20–30% больше, чем в применяемой подвижной фазе.

Вообще, если концентрация солевого буфера достаточно высока, то сначала лучше промыть колонку смесью ацетонитрил–вода 1:9 в воде для удаления соли. И только затем применять промывочную смесь с высоким содержанием ацетонитрила.

И не забудьте, что после промывки колонку необходимо заново откондиционировать.

Одним словом, на эти промывки, по-моему, тратят слишком большое количество рабочего времени. . .

- ***А можно как-то сократить время, затрачиваемое на промывки?***
- Если колонка используется непрерывно, то ее нецелесообразно промывать. Жидкостную систему прибора

промывать от солей в конце дня надо, а колонку — совершенно необязательно. Ее же потом нужно опять кондиционировать, а это опять время.

- *Но промывки продлевают срок жизни колонки!*
- Недоказанное утверждение. Смотря в каких условиях. При экстремальных рН подвижной фазы — скорее всего да, несколько продляют. Но тут уже надо смотреть, какая цель стоит — нормально работать или в ущерб нормальной работе беречь колонку.

Вот если колонку оставляют без работы на продолжительное время (хотя бы на выходные), то обращенно-фазовую колонку можно промыть. Раз в неделю. Но не в случае ион-парных разделений, разумеется.

- *На многих предприятиях начальная и конечная промывка колонок (start wash, end wash) является обязательной процедурой. Выходит, что это неверно?*
- Если такую процедуру предписано проводить каждый день для колонок всех применяемых типов и без учета агрессивности применяемых подвижных фаз, то, безусловно, это неразумно. Бездумный подход здесь крайне нежелателен.

Но промывать колонки можно, если это обращенно-фазовые колонки на силикагельной основе с неполярной прививкой типа С8 или С18, а также неполярным энд-кеппингом. Для таких колонок правильная промывка безопасна, а их повторное кондиционирование не занимает много времени.

- ***Какие предосторожности необходимо соблюдать при промывке колонок?***
- Вы будете смеяться над главной рекомендацией.

- *Это уже интересно.*
- *Надо быть сытым и заниматься этим в спокойной обстановке. То есть в идеале — после обеда.*

Большая часть колонок была убита мной в голодном и нервном состоянии, когда все валится из рук. В таком состоянии очень просто перепутать банки с растворителем или подвижной фазой. Особенно если работа ведется очень быстро.

- *Ценный совет. А чего не следует делать в частности?*
- *Не следует промывать колонку теми растворителями, с которыми она несовместима. Любые обращенно-фазовые колонки — и на основе силикагеля, и полимерные — несовместимы с любыми углеводородными и хлорорганическими растворителями. Самые неполярные подвижные фазы для обращенно-фазовых колонок — это смеси ацетонитрил – ТГФ 1:1, ацетонитрил – дихлорметан 80:20. Несколько более устойчивы к неполярным растворителям С8 и С30 фазы, на них можно работать на подвижных фазах с более высоким содержанием ТГФ, но это уже экзотика.*

И еще очень важный совет для тех, кто любит промывать обращенно-фазовые колонки чистым изопропанолом. Делайте это только путем промежуточного перехода на чистый ацетонитрил. То есть не следует промывать колонку сразу чистым изопропанолом, если она заполнена смесью растворителей с долей воды, а тем более — чистой водой. Это может привести к дестабилизации упаковки адсорбента и уменьшению ее эффективности. Сначала вымойте из колонки соли (например, смесью ацетонитрил – вода 9:1), затем заполните ее чистым ацетонитрилом — и лишь затем аккуратно чистым изопропанолом. После промывки изопропанолом первым делом опять перезаполните колонку ацетонитрилом.

– **В чем следует хранить обращенно-фазовые колонки?**

- В принципе, их можно хранить в той же смеси ацетонитрил – вода 1:9, которая применяется для ее промывки. Но для длительного хранения лучше применять смесь ацетонитрил – вода 1:1.

Есть еще один способ консервации обращенно-фазовых колонок – в изопропанол. Для полимерных обращенных фаз этот способ лучше не применять, т. е. использовать его только для фаз на основе силикагеля. В этом случае колонка промывается последовательно смесью ацетонитрил – вода 1:9 и ацетонитрилом, и лишь заполненную ацетонитрилом колонку аккуратно перезаполняют изопропанолом на небольшой объемной скорости.

– **От чего обращенно-фазовые колонки выходят из строя?**

- От того же, что и все ВЭЖХ колонки. Напомню, что в общем случае колонки выходят из строя по трем причинам: неправильной эксплуатации пользователем, наличия скрытых дефектов в упаковке колонки, а также по естественным причинам, т. е. в результате постепенного износа.

Среди причин неправильной эксплуатации обращенно-фазовых колонок лидирует засорение фрита (входного фильтра) колонки. Засорение происходит либо механическими загрязнениями, присутствующими в пробе, либо при выпадении в осадок на фрите неполярных компонентов матрицы образца, нерастворимых в применяемой подвижной фазе.

– *Что можно сделать в этом случае?*

- Кроме очевидной рекомендации готовить хорошие пробы для ВЭЖХ?