

В.Д. ШАТЦ О.В. САХАРТОВА

# ВЫСОКО-ЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Основы теории. Методология.  
Применение в лекарственной химии.

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Современное развитие химических и биологических наук потребовало более глубокого проникновения в существо изучаемых процессов, детального анализа химического состава разнообразных смесей и биологических объектов. Кроме того, для химического и биотехнологического производства, в том числе для промышленности лекарственных средств, характерны постоянное возрастание требований к чистоте выпускаемых продуктов, ужесточение методов контроля, тенденция к использованию количественных критериев при оценке качества. Поэтому помимо оценки интегральных характеристик, присущих объекту исследования в целом, часто требуется детальное изучение содержания отдельных компонентов, определяющих состояние биологических систем либо качество химических продуктов. Решение этих задач, как правило, невозможно без применения достаточно эффективных методов разделения сложных смесей. Среди таких методов доминирует хроматография. Бурно развиваясь в последние десятилетия, этот метод открыл возможности разделения смесей, содержащих десятки и сотни компонентов, их качественного и количественного анализа, препаративного выделения индивидуальных веществ. Принципы хроматографии весьма универсальны, благодаря чему она оказалась пригодной для изучения объектов самой различной природы — от нефти и газов атмосферы до белков, нуклеиновых кислот и даже вирусов. Этим объясняется огромный интерес представителей различных научных и технических дисциплин к хроматографическим методам. Только в пяти специализированных международных журналах по хроматографии ежегодно выходит в свет свыше 2000 публикаций по различным вопросам теории и применения метода, общее же их число в несколько раз больше.

В колоночной жидкостной хроматографии достигнуты невиданные ранее скорость и эффективность разделения, поэтому данная разновидность стала одной из наиболее популярных в исследовательской практике и все шире внедряется для контроля производственных процессов.

Во всем мире растет выпуск приборов для жидкостной хроматографии, стремительно увеличивается численность работников науки и производства, использующих этот метод для решения своих конкретных задач. В такой ситуации крайне необходима литература, позволяющая ознакомиться с основами теории и закономерностями хроматографии, наиболее значимыми в практической работе. Указанным вопросам посвящены главы 1—4 настоящего издания. В главе 5 освещены вопросы аппаратного оформления метода, даются рекомендации по приемам практической работы и рациональному проведению эксперимента. В главе 6 показаны пути решения некоторых типичных аналитических проблем, характерных для химии лекарственных веществ, других продуктов органического синтеза. Наконец, в справочной главе 7 в компактной форме обобщены литературные сведения о методах жидкостного хроматографического анализа лекарственных веществ.

Авторы глубоко признательны В. Ф. Шатц, В. А. Беликову и сотрудникам отдела научно-технической информации Института органического синтеза АН ЛатвССР за помощь в оформлении рукописи, а также всем коллегам по хромаго-графическому центру этого института, чей опыт был использован при подготовке данного издания.

Все пожелания читателей по улучшению содержания книги будут полезны нам в дальнейшей работе.

*Авторы*

## ВВЕДЕНИЕ

Период, наступивший в аналитической химии органических соединений с начала 60-х годов, без преувеличения может быть назван эпохой хроматографии. Один из вариантов этого метода — колоночная жидкостная хроматография — был создан русским ботаником М. С. Цветом в начале века [31]. На протяжении последующих 40 лет хроматография не находила широкого практического применения. Однако в этот период были выполнены работы, имевшие принципиальное значение и заложившие основы тонкослойной [9] и распределительной хроматографии [288]. Лишь после 1950 г. приходит время признания хроматографии, созревания ее как эффективного метода разделения сложных смесей соединений и их анализа. В 1952 г. были выполнены первые работы по газожидкостной хроматографии [216], а вскоре освоен выпуск газовых хроматографов, и в течение последующих 20 лет газохроматографический анализ стал основным методом исследования смесей летучих термически устойчивых соединений. Но большинство органических веществ не обладает необходимой для газовой хроматографии летучестью и термостойкостью, и хроматографировать их можно только в более мягких условиях, характерных для жидкостной колоночной хроматографии. Скорость же и эффективность разделения, а также чувствительность анализа по этому методу долго оставались неудовлетворительными. И лишь в 1965—1975 гг. были в принципе решены основные научные и технологические проблемы, сдерживавшие развитие метода. Последовавший затем прогресс был столь поразителен, что современная инструментальная разновидность метода получила самостоятельное наименование — высокоэффективная жидкостная хроматография.

Важнейшим катализатором развития хроматографической науки и практики были потребности разных естественных и технических наук, начиная от медицины и кончая криминалистикой, не говоря уже о науках химических и биологических. Внедрение хроматографических методов в эти области радикальным образом изменило тактику и методику исследований, обеспечило новые возможности контроля ряда производств. Хроматографическое оборудование сейчас можно увидеть и в химической лаборатории, и в цехе, и в больнице, и в кабине космического корабля. Что же представляет собой современная хроматография? С одной стороны, это практически полезный метод сорбционного разделения смесей в динамических условиях, а с другой — это наука, изучающая закономерности поведения молекул химических соединений, перемещающихся в системах, состоящих из слоя зернистой неподвижной фазы и протекающей через слой жидкой либо газообразной подвижной фазы. Поскольку здание хроматографической науки еще далеко от завершения, хроматография в некоторых, наиболее трудных областях и по сей день остается искусством, хотя бы и основанным на фундаментальных научных принципах.

Можно утверждать, что внедрение хроматографии прививает современному химику новый взгляд на вещества и смеси, которые он исследует. Оказывается, ни одно вещество не такое чистое, каким кажется, и ни одна смесь не такая простая, какой кажется, пока они досконально не изучены хроматографическими методами. В справедливости этого пессимистического тезиса убедился, наверное, каждый, в чью работу хроматография вошла прочно. Но пессимизм здесь только в форме, а не в содержании, так как обнаружение в смеси с помощью хроматографии новых компонентов или примесей может обернуться ценным научным результатом или по меньшей мере предотвратить ошибочные решения и выводы. Резюмируя сказанное, попытаемся дать определение хроматографии, хотя и сознаем, что ни одно определение здесь не может быть исчерпывающим. Итак, хроматография — это комплексная научно-техническая дисциплина, включающая в себя:

- теоретические разделы, посвященные законам сорбции и массопередачи в динамических условиях, межмолекулярным взаимодействиям сорбат—сорбент;
- методологические и прикладные исследования, направленные на создание общих подходов и конкретных режимов разделения и анализа;
- исследования по созданию материального фундамента хроматографии — приборов, сорбентов.

Эти три направления, которые можно условно объединить термином «профессиональная хроматография», развиваются в гармонической взаимосвязи. Благодаря совместным усилиям

хроматографистов-профессионалов во всем мире жидкостная хроматография постепенно становится все более доступной широкому кругу ученых и практиков, для которых она является инструментом решения конкретных задач в своей области. Современное состояние этого метода отражено в довольно обширной литературе, вышедшей за рубежом за последние годы [56, 92, 226, 316, 367, 375].

Авторы настоящей монографии в течение ряда лет занимаются разработкой жидкостных хроматографических методов разделения различных смесей органических соединений — от продуктов основного органического синтеза до лекарственных веществ и их метаболитов, выделенных из биологических объектов. В центре внимания постоянно находилась взаимосвязь, существующая между строением веществ, составом хроматографической системы, условиями ее работы и величинами удерживания разделяемых соединений. К сожалению, уровень теории жидкостной хроматографии, которая тесно связана с теорией растворов, пока не позволяет с достаточной для практических целей точностью описывать и предсказывать поведение сложных органических соединений. Именно по этой причине мы вслед за нашими предшественниками широко используем феноменологическое моделирование. Этот путь, не претендуя на глубину физико-химического описания процесса, в то же время дает возможность выявить многие существенные его стороны и, по нашему мнению, в обозримом будущем останется в жидкостной хроматографии как единственный подход, приносящий реальные плоды хроматографисту-практику. Общую цель наших исследований можно сформулировать как создание системы представлений и моделей, пригодных в качестве инструмента при интерпретации и прогнозировании хроматографических данных.

Определяя круг вопросов, подлежащих рассмотрению в рамках данной книги, мы, естественно, исходили из того, что объекты наших исследований и научные интересы в значительной степени связаны с потребностями химии лекарственных веществ. Это наряду с определенным объемом справочного материала, приводимого в книге, и послужило поводом к выбору названия. Вместе с тем ясно, что с точки зрения методологии хроматографии лекарственные соединения ничем не отличаются от других органических веществ. Поэтому мы широко привлекали данные, касающиеся других органических соединений, и выражаем надежду, что представленный материал будет полезен не только специалистам по хроматографии лекарств. Учитывая то, что литература по современной высокоэффективной жидкостной хроматографии на русском языке весьма ограничена [1, 8, 12, 13, 16, 19, 26, 27, 30, 37], а метод продолжает стремительно развиваться, мы включили также ряд общеметодических разделов. Сознательно оставлены за пределами книги вопросы, относящиеся к анализу лекарственных препаратов в биологических объектах. По нашему мнению, центральной проблемой в этом случае является не столько хроматография, сколько поиск адекватных методов подготовки пробы к исследованию. Учитывая, что громадное большинство лекарственных веществ — низкомолекулярные соединения, мы сочли нецелесообразным рассматривать здесь эксклюзионную хроматографию. Анализ литературных данных показывает, что роль ионообменной хроматографии при изучении лекарственных веществ невелика и имеет тенденцию к снижению; поэтому указанная разновидность хроматографии нами здесь не обсуждается.

Таким образом, цель данной книги заключается в том, чтобы, не заостряя внимание на аспектах, которые по тем или иным причинам менее существенны при практическом использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии, представить основную теоретическую и методическую информацию, необходимую для сознательного освоения данного метода, рекомендации по эффективному и целенаправленному выбору условий хроматографирования.

# 1. ПРИНЦИПЫ И ОСНОВЫ ТЕОРИИ ХРОМАТОГРАФИИ

## 1.1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС: УДЕРЖИВАНИЕ, РАЗМЫВАНИЕ, РАЗДЕЛЕНИЕ

Основные элементы хроматографического процесса рассмотрим на примере разделения бинарной смеси в условиях колоночной жидкостной адсорбционной хроматографии. Представим себе трубку, заполненную пористым адсорбентом (колонку), через которую непрерывно течет растворитель (рис. 1.1). Адсорбент (сорбент, наполнитель колонки) удерживается в колонке фильтрами, он неподвижен и потому часто называется неподвижной фазой. Растворитель, перемещающийся относительно сорбента, называют также подвижной фазой (и в некоторых случаях — элюентом). Введем в верхнюю часть колонки по одной молекуле соединений — сорбатов, обозначаемых далее X и Y. При движении вдоль колонки эти молекулы будут диффундировать внутрь пор сорбента и в результате межмолекулярных взаимодействий того или иного типа адсорбироваться на поверхности неподвижной фазы. Доля времени, в течение которой молекулы находятся в адсорбированном состоянии, определяется силой межмолекулярного взаимодействия сорбатов X, Y с сорбентом. При очень слабой адсорбции молекулы почти все время проводят в растворе подвижной фазы и поэтому перемещаются вниз по колонке со скоростью, лишь незначительно уступающей скорости движения подвижной фазы. Наоборот, при очень сильной адсорбции молекулы X и Y почти не отрываются от поверхности и скорость их перемещения вниз по колонке крайне незначительна.

С точки зрения хроматографии нас больше всего интересуют такие условия, в которых сила адсорбции промежуточная и скорость перемещения X и Y по колонке в 2—10 раз меньше скорости движения подвижной фазы. Явление замедленного движения молекул X и Y относительно движения молекул подвижной фазы в хроматографии называется удерживанием. Если константы сорбции веществ X и Y различны, то различаться будет и их средняя скорость смещения по колонке. Молекула X, в нашем примере сорбирующаяся слабее, при движении по колонке обгонит молекулу Y, и из колонки они выйдут в разные моменты времени. Таким образом будет достигнута основная цель хроматографии — разделение.

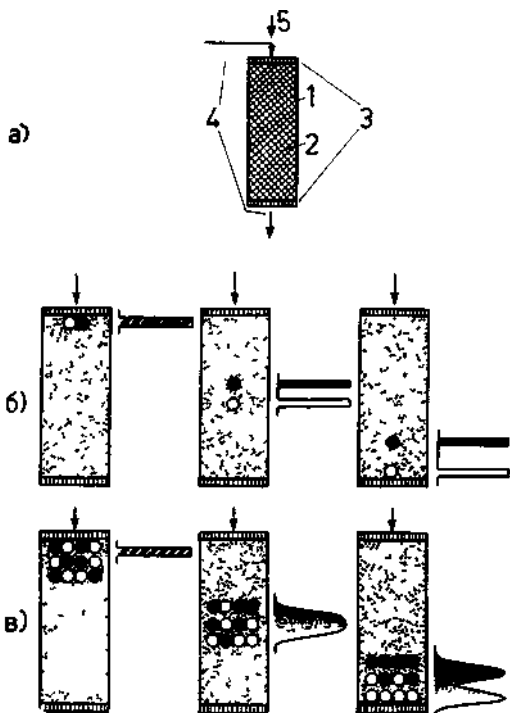


Рис 1.1 Принципиальная схема хроматографического эксперимента а — Колонка 1 — корпус, 2 — сорбент, 3 — фильтры, 4 — вход и выход подвижной фазы 5 — ввод разделяемой смеси б — Гипотетическое разделение двух разных молекул X (○) и Y (●) линия правее колонки изображает распределение молекул двух видов по высоте слоя в — Размывание зон при разделении реальной пробы вследствие отклонения скоростей перемещения отдельных молекул от средней для данного вида молекул величины

Естественно, на практике в колонку не вводят единичные молекулы, и поэтому данная картина предельно упрощает реальную ситуацию. Если в колонку введем хотя бы несколько молекул каждого вида, то обнаружим, что средние скорости перемещения молекул X и Y по-прежнему различны. Помимо этого, скорости перемещения отдельных молекул каждого вида отклоняются в ту или иную сторону от среднего для данного вида значения. Молекулы

сорбатов, первоначально введенные в колонку в виде мгновенного импульса, выходят из нее более широкой зоной. Такая неидентичность скоростей перемещения одинаковых молекул в хроматографии называется размыванием, оно связано с рядом явлений в колонке, которые

более подробно рассмотрены ниже. Это не желательное явление приводит к тому, что среди молекул X могут находиться и такие «медленные», скорость которых близка к скорости наиболее «быстрых» молекул Y. В результате зоны X и Y могут частично наложиться одна на другую и разделение окажется неполным (рис. 1.1, в).

Описанные процессы — удерживание и размывание — послужили главным предметом исследования хроматографической науки, основная задача которой — поиск физических и химических условий, при которых разница в средней скорости перемещения по колонке молекул X и Y была бы оптимальной, а процессы размывания свелись бы к минимуму.

## 1.2 КЛАССИФИКАЦИЯ ВИДОВ ХРОМАТОГРАФИИ

К настоящему времени разработана довольно всесторонняя классификация видов хроматографии. Она детально обсуждена в литературе [27, 30, 92, 130, 131, 316, 375], однако целесообразно повторить ее основные принципы.

С точки зрения формы сорбционного слоя хроматографию подразделяют на колоночную и плоскостную (планарную). В первом случае сорбенту придается форма цилиндра и движение подвижной фазы направлено вдоль оси этого цилиндра. Во втором случае сорбент размещается параллельно некоторой плоскости и движение подвижной фазы параллельно ей.

С точки зрения способа ввода в колонку разделяемой смеси, наличия и роли подвижной фазы помимо описанной выше проявительной (элютивной) хроматографии различают фронтальную и вытеснительную. При фронтальном методе разделяемая смесь сама выступает в роли подвижной фазы: на выходе из колонки сначала появляется наименее сорбирующийся компонент, а затем последовательно выходят его смеси с другими, сильнее сорбируемыми компонентами. При вытеснительной хроматографии сорбент насыщается по всей длине колонки разделяемой смесью, после чего в колонку подается вещество вытеснитель, сорбирующееся сильнее всех компонентов смеси. В настоящее время в аналитической практике используется исключительно проявительная хроматография, фронтальный и вытеснительный методы более перспективны при препаративном выделении соединений. С точки зрения агрегатного состояния подвижной фазы хроматографию подразделяют на газовую и жидкостную, в первом случае подвижная фаза газообразна, во втором — представляет собой жидкость.

Разнообразны механизмы взаимодействия молекул сорбата с неподвижной фазой, и это также может служить основой классификации. Так, если молекулы сорбата связываются с поверхностью твердого адсорбента за счет дисперсионных, ориентационных, индукционных и донорно-акцепторных взаимодействий, процесс называют адсорбционной хроматографией. Такие же взаимодействия могут иметь место и в том случае, когда неподвижная фаза жидкая и происходит растворение молекул сорбата в ее объеме. Этот вид хроматографии называют распределительным. При сорбции на твердой поверхности или в жидкости может происходить обмен ионами или лигандами, в этих случаях имеет место ионо- или лигандообменная хроматография. Наконец, сорбция как таковая может отсутствовать, а причиной разделения служит различная эффективная скорость диффузии молекул разных размеров внутри пор неподвижной фазы. Такие режимы разделения называют ситовыми. Классификация видов хроматографии по механизму взаимодействия сорбат—сорбент достаточно условна, так как очень часто в реальной колонке параллельно могут протекать различные процессы, причем вклад каждого из них сильно зависит от природы разделяемых веществ.

Рассмотрение этой традиционной классификации показывает отсутствие в ней места для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). С формальной точки зрения это совершенно правильно, так как ВЭЖХ, согласно приведенным признакам, всего лишь жидкостная колоночная хроматография, а механизмы сорбции в ВЭЖХ могут использоваться самые различные. По существу, ВЭЖХ — это современная форма реализации классической жидкостной колоночной хроматографии. Ниже перечислены некоторые наиболее существенные ее черты, которые, по нашему мнению, свидетельствуют не о простом улучшении классического варианта, а о его качественно новом уровне:

— высокая скорость процесса, позволившая сократить продолжительность разделения от нескольких часов и суток до минут;

— минимальная степень размывания хроматографических зон, что дало возможность разделять соединения, лишь незначительно различающиеся по константам сорбции;

— высокая степень механизации и автоматизации разделения и обработки информации, благодаря чему колоночная жидкостная хроматография достигла нового уровня воспроизводимости и точности. Именно это обстоятельство превратило ВЭЖХ в мощнейший из современных методов анализа сложных смесей.

Ранее довольно часто по отношению к ВЭЖХ применялся термин «жидкостная хроматография высокого давления», однако на современном этапе развития метода рабочие давления несколько снизились, к тому же совершенно ясно, что давление само по себе не является характеристикой процесса и его единственная роль чисто механическая — обеспечить необходимую скорость потока подвижной фазы.

Интенсивные исследования последних десятилетий, громадный объем накопленных экспериментальных данных позволяют сегодня уже говорить о классификации вариантов в рамках метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Конечно, при этом остается в силе классификация по механизму сорбции, приведенная выше. Однако часто в литературе по ВЭЖХ используются и другие классификация и терминология, не всегда до конца логичные. Так, в соответствии с типом сорбента можно различать хроматографию в системах жидкость— твердое тело, распределительную, на химически связанных неподвижных фазах. Часто, в особенности в зарубежной литературе, хроматографию на твердых адсорбентах относят к адсорбционной. Как показали исследования, ставить знак равенства между этими двумя терминами нельзя, так как не всегда именно поверхность твердого адсорбента ответственна за удерживание — зачастую главную роль играет адсорбированный на ней слой компонентов подвижной фазы (хроматография на динамически модифицированных сорбентах). С другой стороны, сорбция на химически связанных неподвижных фазах часто имеет обычный адсорбционный механизм.

Весьма распространена классификация, основанная на сравнительной полярности подвижной и неподвижной фаз. При этом различают нормально- и обращенно-фазовую хроматографию. В первом случае неподвижная фаза более полярна, чем подвижная, во втором — наоборот. Последние два термина лишены физического смысла и лишь связаны с тем обстоятельством, что исторически первым вариантом была именно хроматография на полярных сорбентах в относительно малополярных подвижных фазах.

Из сказанного ясно, что создание полной и непротиворечивой классификации вариантов ВЭЖХ — довольно трудная задача не только по существу, но и потому, что многие неудачные термины укоренились в практике и литературе, по-видимому, на долгое время. Необходимость упорядочения, однако, назрела, в силу чего в рамках данной книги в качестве рабочего варианта предлагается следующая классификация. Вряд ли и она свободна от недостатков, но, на наш взгляд, может служить разумным компромиссом между физико-химической обоснованностью и исторически сложившейся практикой:

— нормально-фазовая хроматография — такой вариант ВЭЖХ, когда подвижная фаза менее полярна, чем неподвижная, и есть основания считать, что основным фактор, определяющий удерживание, — это взаимодействие сорбата непосредственно с поверхностью либо объемом сорбента;

— обращенно-фазовая хроматография — такой вариант ВЭЖХ, когда подвижная фаза более полярна, чем неподвижная, и удерживание определяется непосредственным контактом молекул сорбата с поверхностью или объемом сорбента; при этом ионизированные сорбаты не обмениваются на ионы подвижной фазы, сорбированные на поверхности;

— ионообменная хроматография — вариант, при котором сорбция осуществляется путем обмена сорбированных ионов подвижной фазы на ионы хроматографируемых веществ; полностью аналогично можно определить лигандообменную хроматографию;

— хроматография на динамически модифицированных сорбентах — вариант ВЭЖХ, при котором сорбат не взаимодействует непосредственно с поверхностью сорбента, а вступает в ассоциацию с молекулами приповерхностных слоев элюента. Состав этих слоев, находящихся в динамическом равновесии с подвижной фазой, отличается от среднего для данного эксперимента

состава подвижной фазы;

— ион-парная хроматография — такой вариант обращенно-фазовой хроматографии ионизированных соединений, при котором в подвижную фазу добавляется гидрофобный противоион, качественно изменяющий сорбционные характеристики системы;

— эксклюзионная хроматография — способ разделения соединений по их молекулярным массам, основанный на различии в скорости диффузии в порах неподвижной фазы молекул различных размеров.

### 1.3. НЕКОТОРЫЕ ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Хроматограмма — кривая, изображающая зависимость концентрации соединений, выходящих с потоком подвижной фазы из колонки, от времени с момента начала разделения (рис. 1.2). Хроматограмма обычно состоит из базовой линии 1 и пиков 2. В хроматографических приборах, как правило, не происходит непосредственного измерения концентрации вещества в подвижной фазе, а с помощью специального узла — детектора измеряется какая-либо физическая величина, функционально связанная с концентрацией. Базовая линия соответствует тому промежутку времени, в течение которого детектор регистрирует сигнал только от подвижной фазы. Пик — кривая, в идеале приближающаяся к кривой гауссова распределения, описывает постепенное нарастание концентрации вещества на выходе из колонки и последующее ее уменьшение.

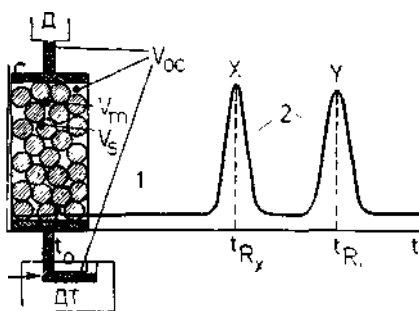


Рис. 1.2. Хроматограмма: 1 — базовая линия; 2 — пики;  $t$  — время; С — сигнал детектора.

Рис. 1.3 Схематическое изображение объемов в хроматографической колонке. Пропорции изменены для наглядности. Д — дозатор; ДТ — детектор. Объем подвижной фазы не заштрихован, внеколоночные объемы заштрихованы

дважды.

Время появления максимума пика на хроматограмме называется временем удерживания  $t_R$ , где  $i$  — индекс, соответствующий  $i$ -му компоненту разделяемой смеси. При постоянных условиях работы и составе фаз хроматографической системы время удерживания является величиной, постоянной для данного вещества. Иногда в начальной части хроматограммы регистрируется небольшой пик, природа которого связана с кратковременным нарушением равновесия в колонке при вводе пробы. Этому пику соответствует время удерживания несорбирующегося вещества  $t_0$  и свободный объем системы. Свободный объем системы  $V_{oc}$  — это объем, занимаемый подвижной фазой от устройства для ввода пробы до детектора. Часть свободного объема системы, находящаяся в пределах колонки, называется свободным объемом, колонки  $V_m$  (рис. 1.3). В идеале свободный объем системы не должен превышать свободный объем колонки. В современных жидкостных хроматографах внеколоночные объемы сведены к минимуму, и измеряемую экспериментально величину  $t_0$  в первом приближении можно считать отвечающей свободному объему колонки. Свободный объем колонки — ее важная характеристика, для его определения в изучаемую смесь иногда специально вводят несорбирующееся соединение для измерения  $V_s$ . Однако, как показано многими исследованиями последних лет, корректное определение свободного объема — весьма нелегкая, если вообще разрешимая задача. В противоположность свободному объему различают объем неподвижной фазы в колонке  $V_s$ . Отношение этих величин называют фазовым отношением колонки  $\phi$ :

$$\phi = V_s / V_m \quad (1.1)$$

Фазовое отношение — также важная характеристика системы, позволяющая связать хроматографический процесс с аналогичным ему по составу фаз статическим процессом распределения и далее — с термодинамическими характеристиками.



Итак, процесс удерживания данного вещества в принятой нами терминологии описывается временем удерживания — первой величиной, измеряемой в ходе хроматографического эксперимента. Однако помимо физико-химических факторов время удерживания определяется также скоростью подачи через колонку подвижной фазы  $F$ . Скорость подачи, или расход подвижной фазы, в первом приближении можно считать параметром, не влияющим на распределение. Удерживаемый объем данного вещества рассчитывается по формуле

$$V_R = t_R \cdot F \quad (1.2)$$

и, естественно, для данной колонки уже не зависит от расхода подвижной фазы. Удерживаемый объем является константой данного вещества на данной колонке в подвижной фазе данного состава, но на колонке других размеров он изменяется, несмотря на то, что используются те же сорбент и подвижная фаза. При внимательном рассмотрении хроматограммы, полученной в новых условиях, можно обнаружить, что пропорционально изменяется и значение  $t_0$ . Коэффициент емкости данного соединения в данной хроматографической системе рассчитывается по формуле

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.3)$$

Этот параметр не зависит от размеров колонки и широко используется в хроматографической литературе и расчетах. Коэффициент емкости не является чисто формальной величиной, он непосредственно связан с коэффициентом распределения в данной системе  $K$  и свободной энергией сорбции  $\Delta G$ :

$$k' = K \cdot \varphi = \varphi \cdot e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \quad (1.4)$$

Коэффициент емкости не зависит от большинства экспериментальных факторов, однако, как видно из (1.4), фазовое отношение (и, следовательно, плотность упаковки колонки) влияет на данный параметр сильно. Для устранения этого влияния в газожидкостной хроматографии в 1959 г. Ковачем [266] был предложен *индекс удерживания*

$$I_i = 100n + 100 \frac{\lg(t_{R_i} - t_0) - \lg(t_{R_n} - t_0)}{\lg(t_{R_{n+1}} - t_0) - \lg(t_{R_n} - t_0)} \quad (1.5)$$

где  $t_{R_n}$  и  $t_{R_{n+1}}$  — время удерживания  $n$ -алканов с  $n$  и  $n+1$  атомами углерода, выходящих из колонки до и после рассматриваемого соединения с временем удерживания  $t_{R_i}$ . Эта интерполяционная характеристика не зависит от фазового отношения и завоевала большую популярность, став основным средством описания поведения в газожидкостной хроматографии [82]. В ВЭЖХ также предложена аналогичная величина. В качестве ряда стандартов использованы метил- $n$ -алкилкетоны C3—C23 [53, 362] либо конденсированные полиядерные ароматические соединения [448]. Однако пока индексы удерживания широкого применения в ВЭЖХ не нашли.

Сравнительную термодинамическую характеристику двух разделяемых соединений дает *относительное удерживание*, или *селективность*:

$$\alpha_{ij} = \frac{t_{R_i} - t_0}{t_{R_j} - t_0} \quad (1.6)$$

Необходимо отметить, что уже с давних времен в дискуссиях хроматографистов и литературе привилось довольно свободное обращение с термином «селективность», так что не всегда можно понять, что именно имеется в виду. Согласно (1.6), селективность — это способность данной хроматографической системы разделять данную пару веществ  $i, j$ . Поэтому все рассуждения на тему о селективности тех или иных систем бессмысленны без указания, по отношению к каким объектам селективность проявляется.

Времена удерживания и все производные от них величины являются по существу термодинамическими характеристиками процесса. Однако, как в любом другом химическом процессе, в хроматографии результат определяется совместным влиянием факторов термодинамического и кинетического типа. Если в хроматографической системе данного состава при данной температуре у двух веществ значения  $t_R$  одинаковы (или  $\alpha=1,0$ ), то никакое изменение геометрии колонки, расхода элюента и других параметров не приведет к успешному разделению

этой пары. Но, с другой стороны, различие значений  $t_R$  вовсе не означает автоматически, что разделение, а тем более хорошее, будет достигнуто. Для этого используемая колонка должна обладать достаточно высокими кинетическими характеристиками. Акты сорбции—десорбции должны совершаться с большой скоростью, чтобы реализовать потенциальную возможность разделения, на которую указывает различие в значениях  $t_R$ .

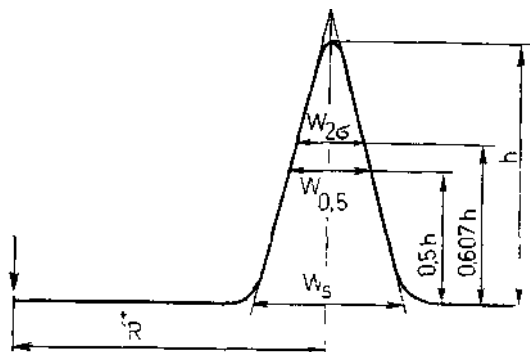


Рис. 1.4. К определению эффективности колонки.

Основная кинетическая характеристика процесса — высота  $H$ , эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ). Эта величина соответствует высоте слоя сорбента, при прохождении которой акт сорбции—десорбции успевает совершиться в среднем один раз. Она отражает по существу качество использованного сорбента, качество заполнения колонки и правильность выбора режима хроматографирования. Для оценки качества колонки применяется обратная величина — число теоретических тарелок  $N$ :

$$N = L/H, \quad (1.7)$$

где  $L$  — длина колонки, мм.

Число теоретических тарелок служит мерой эффективности колонки. Его рассчитывают как функцию времени удерживания и ширины пика (рис. 1.4) по формуле:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{w_s} \right)^2 = 4 \left( \frac{t_R}{w_{2\sigma}} \right)^2 \quad (1.8)$$

где  $w_s$  — ширина пика у основания;  $w_{0.5}$  — ширина пика на уровне 0,5 высоты;  $w_{2\sigma}$  — ширина пика на уровне 0,607 высоты. Совместное влияние селективности, удерживания и эффективности на результат разделения демонстрирует рис. 1.5. Наглядно видно, что большие значения  $\alpha$  и  $N$  способствуют более полному разделению. В то же время даже при достаточной разнице в удерживании разделение неудовлетворительно, если недостаточна эффективность. В качестве численной меры степени разделения двух компонентов используется критерий разделения  $R_s$ . Он

может быть рассчитан на основании измерений хроматограммы веществ  $X$  и  $Y$ :

$$R_s = \frac{2(t_{RY} - t_{RX})}{w_{sY} + w_{sX}} \quad (1.9)$$

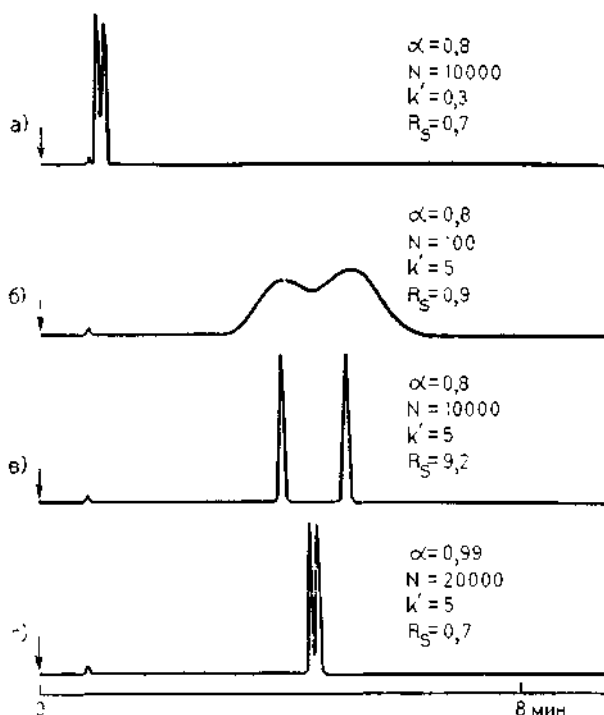


Рис. 1.5. Влияние удерживания ( $k'$ ), селективности ( $\alpha$ ) и эффективности ( $N$ ) на разделение, а —  $\alpha$  и  $N$  оптимальны,  $k'$  мало; б —  $\alpha$  и  $k'$  оптимальны,  $N$  мало; в —  $\alpha$ ,  $N$  и  $k'$  оптимальны; г — удовлетворительное разделение соединений с малым значением  $\alpha$  на колонке повышенной эффективности.

Критерий разделения связан с основными характеристиками системы следующим соотношением:

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left( \frac{\bar{k}'}{1 + \bar{k}'} \right) \sqrt{N}$$

где  $k'$  — среднее значение коэффициентов емкости разделяемой пары веществ.

#### 1.4. РАЗМЫВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ЗОН

Рассмотрим факторы, определяющие форму хроматографических зон в проявительной хроматографии. Разделяемая смесь вводится в колонку в виде узкого импульса, и его объемом по сравнению с объемом колонки можно пренебречь. По мере перемещения молекул разделяемых веществ с потоком подвижной фазы импульс непрерывно расширяется, при этом концентрация разделяемых молекул в нем уменьшается. Главная причина данного процесса в том, что скорость перемещения по колонке отдельных молекул отличается от средней скорости, характерной для данного соединения. С точки зрения конечного полезного результата хроматографического процесса — достижения разделения молекул различных видов — размывание зон крайне нежелательно, по крайней мере по следующим причинам. Во-первых, интенсивное размывание ведет к частичному перекрытию зон различных соединений, и потому приходится предъявлять более жесткие требования к селективности системы. Причем, даже если в том или ином случае удастся обеспечить повышенную селективность, общая разделяющая способность невелика. Другое отрицательное следствие размывания — уменьшение концентрации сорбата в центре зоны, ведущее к снижению чувствительности при анализе и дополнительным трудностям при препаративном выделении чистых веществ.

Мерой интенсивности процессов размывания является высота, эквивалентная теоретической тарелке. Величина  $N$  определяется рядом частных процессов, детально рассмотренных еще в работах [143, 144], основные выводы которых полностью применимы и к высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Неоднородность потока подвижной фазы.** Сорбент, находящийся в хроматографической колонке, можно считать системой взаимопересекающихся каналов, в которых в результате вихревой диффузии скорость переноса подвижной фазы отдельных молекул может различаться. Этому процессу отвечает составляющая

$$H_H = 2\lambda d_p, \quad (1.11)$$

где  $d_p$  — размер частиц сорбента;  $\lambda$  — коэффициент вихревой диффузии — мера неоднородности потока подвижной фазы.

**Продольная молекулярная диффузия в подвижной фазе.** Молекулы хроматографируемых соединений распределены между подвижной и неподвижной фазами, и в каждой из этих фаз протекают процессы молекулярной диффузии. Все молекулы данного вида проводят в подвижной фазе в среднем одно и то же время,  $t=L/u$ , где  $L$  — длина колонки,  $u$  — линейная скорость подвижной фазы. В течение этого периода молекулы сорбата диффундируют относительно центра зоны. На основании уравнения Эйнштейна может быть получено выражение, описывающее этот тип размывания зоны:

$$H_{D,M} = 2\gamma D_{MM}/u, \quad (1.12)$$

где  $D_{MM}$  — коэффициент диффузии;  $\gamma$  — коэффициент, учитывающий затрудненность диффузии в подвижной фазе, расположенной между зернами сорбента. Значение  $\gamma$  приближенно равно 0,6 для обычных насадочных колонок (для идеального капилляра  $\gamma = 1,00$ ).

**Продольная диффузия в неподвижной фазе.** В неподвижной фазе молекулы разделяемых соединений проводят время

$$t_s = \frac{L \cdot k'}{u} \quad (1.13)$$

где  $k'$  — коэффициент емкости. Величина  $t_s$ , в отличие от  $t_0$ , для разных веществ различна. Для неподвижной фазы, как и для подвижной, может быть получено

$$H_{D,S} = \frac{2D_{MS}k'}{u} \quad (1.14)$$

где  $D_{MS}$  — коэффициент диффузии в неподвижной фазе. Обычно в ВЭЖХ значения  $H_{D,S}$  не слишком отличаются от  $H_{D,M}$ .

**Кинетика массопередачи в неподвижной фазе.** Слагаемые размывания, определяемые конечной скоростью процессов сорбции, несколько отличаются в зависимости от того, имеет ли сорбирующий слой бесконечно малую толщину, как при адсорбционной хроматографии, или толщина его существенна, как это имеет место при хроматографии распределительной.

Рассмотрим процесс адсорбции из центра зоны. Считая его протекающим по уравнению первого порядка, можно определить время, необходимое для адсорбции:

$$t_A = \frac{1}{K_A} \quad (1.15)$$

где  $K_A$  — константа скорости адсорбции. За время  $t_A$  центр зоны переместится на расстояние  $(t_0/t_R)ut_A$ , в то время как рассматриваемая нами молекула сместится на  $t_A u$ . В результате этой стадии процесса молекула «обгонит» центр зоны на величину

$$\Delta t = t_A u \left( 1 - \frac{t_0}{t_R} \right) \quad (1.16)$$

При десорбции это расстояние удвоится. Полное число переходов равно  $2L/(u t_A)$ , и отсюда можно получить составляющую ВЭТТ для адсорбционной хроматографии  $H_{K,A}$

$$H_{K,A} = 2 \left( \frac{t_R - t_0}{t_R} \right)^2 \frac{u}{K_A} \quad (1.17)$$

В случае распределительной хроматографии продолжительность десорбции зависит от скорости диффузии в неподвижной фазе и эффективной толщины пленки  $d_f$ . Аналогично (1.17) может быть получено выражение для составляющей ВЭТТ в данном режиме  $H_{K,P}$ :

$$H_{K,P} = 2 \left( \frac{t_R - t_0}{t_R} \right) \left( \frac{t_0}{t_R} \right) d_f^2 u \frac{1}{D_{HS}} \quad (1.18)$$

**Кинетика массопередачи в подвижной фазе.** Этот процесс также определяется диффузией молекул в подвижной фазе, т. е. между частицами сорбента. Длина диффузионного пробега пропорциональна диаметру частиц сорбента, и весь процесс можно рассматривать как протекающий параллельно с размыванием из-за неоднородности потока. Соответствующий вклад в ВЭТТ

$$H_{K,M} = w d_p^2 u \frac{1}{2D_{MM}} \quad (1.19)$$

Наконец, **неравновесность процесса внутри застойных зон** в частицах насадки определяется выражением

$$H_{S,S} = C d_p^2 u \frac{1}{D_{MM}} \quad (1.20)$$

где  $C$  — коэффициент, учитывающий константу сорбционного равновесия и геометрию насадки.

Каждый из рассмотренных процессов вносит свой вклад в суммарную величину ВЭТТ, которая может быть найдена по простому уравнению

$$H = H_H + H_{D,M} + H_{D,S} + H_{K,A} + H_{K,M} + H_{S,S} \quad (1.21)$$

Как видно из уравнений (1.12) — (1.21), многие составляющие ВЭТТ представляют собой функцию линейной скорости потока подвижной фазы. Изучение зависимости ВЭТТ от скорости потока — важный инструмент анализа кинетико-динамических свойств конкретных хроматографических систем. Зависимость  $H$  от  $u$  может быть выражена различными уравнениями, связанными с приведенными выше факторами размывания. Первым уравнением такого типа явилось уравнение Ван-Деемтера [413], которое в упрощенной форме выглядит так:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (1.22)$$

Здесь член  $A$  соответствует вкладу неоднородности потока подвижной фазы; член  $B/u$  — сумме слагаемых, связанных с продольной диффузией ( $H_{D,M}$  и  $H_{D,S}$ ), член  $Cu$  — сумме слагаемых, отражающих кинетику массопередачи ( $H_{K,A}$ ,  $H_{K,P}$ ,  $H_{K,M}$ ). На рис. 1.6 изображена кривая Ван-Деемтера, имеющая в общем случае вид гиперболы. В левой ее части, при малых линейных скоростях потока, основной вклад в размывание зон вносят процессы продольной диффузии. В средней части графика располагается область, соответствующая минимальному для данной колонки значению ВЭТТ и оптимальной величине линейной скорости. При дальнейшем увеличении скорости потока возрастает роль сопротивления массопередаче и ВЭТТ снова увеличивается.

Анализ уравнений (1.11) — (1.22) позволяет выявить влияние некоторых факторов на эффективность колонок. Так, из (1.11) ясно, что для снижения  $H$  необходимо использовать частицы сорбента меньшего размера. Кроме того, в члены, описывающие сопротивление массопередаче, размер частиц входит во второй степени, так что целесообразность уменьшения  $d_f$  для снижения величины  $H$  не вызывает сомнений. К сожалению, использовать этот путь повышения эффективности можно лишь до определенного предела, который диктуется техническими соображениями.

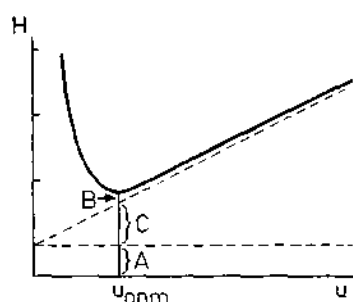


Рис- 1-6- Кривая Ван-Деемтера

Перепад давления в колонке связан с другими параметрами процесса следующим соотношением:

$$\Delta p = \frac{ru}{d_p^2 \cdot L} \quad (1.23)$$

где  $r$  — параметр сопротивления потоку;  $p$  — перепад давления. Двукратное увеличение размера зерен сорбента неизбежно должно привести к четырехкратному увеличению давления для получения прежней скорости элюирования. При повышенных давлениях резко возрастает стоимость и сложность оборудования, и, видимо, в ближайшем будущем средний размер частиц применяемых сорбентов останется на прежнем уровне — между 3 и 10 мкм.

С целью сокращения продолжительности разделения на практике чаще всего используются линейные скорости потока, превышающие значения «Опт- В этой области кривой Ван-Деемтера положительное влияние на эффективность оказывает увеличение коэффициента диффузии в подвижной фазе. Поэтому, если позволяют чисто химические соображения, следует предпочитать подвижные фазы, обладающие меньшей вязкостью.

## 1.5. УДЕРЖИВАНИЕ

Теория хроматографического удерживания решает две основные задачи:

— установление связи между временами удерживания сорбатов и условиями эксперимента;

— установление связи между строением сорбатов и их величинами удерживания.

Первая из этих задач в настоящее время решена на достаточно строгой физико-химической основе, решение второй затруднено недостаточным развитием теории растворов, невозможностью сколько-нибудь полного учета богатой гаммы межмолекулярных взаимодействий в хроматографических системах. Поэтому закономерно, что в данной области основным подходом является полуэмпирическое моделирование, базирующееся на общих представлениях о

механизмах сорбции в системах того или иного типа. С учетом этого настоящий раздел посвящен исключительно первой задаче; вопросы связи между строением сорбатов и удерживанием рассматриваются в последующих разделах, посвященных конкретным разновидностям ВЭЖХ.

Представим себе колонку, заполненную сорбентом, через которую с постоянной скоростью течет поток подвижной фазы. Мысленно введем в такую колонку соединение, не способное сорбироваться неподвижной фазой. Естественно, скорость перемещения молекул этого соединения будет равна линейной скорости перемещения подвижной фазы. Через время  $t_0$  с момента начала эксперимента на выходе из колонки появится максимальная концентрация введенного вещества. Время его выхода из колонки определяется соотношением

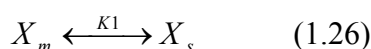
$$t_0 = \frac{V_M}{F} \quad (1.24)$$

и позволяет непосредственно определить линейную скорость подвижной фазы

$$u = L/t_0. \quad (1.25)$$

Здесь  $F$  — расход подвижной фазы в колонке.

Предположим, что в колонку введено  $m$  г соединения  $X$ , способного сорбироваться согласно уравнению



где  $K_1$  — константа равновесия, а индексы  $m$  и  $s$  относятся к подвижной и неподвижной фазам соответственно. Константа равновесия выражается соотношением

$$K_1 = \frac{[X_s]}{[X_m]} \quad (1.27)$$

Далее может быть найдено распределение массы компонента  $X$  между подвижной и неподвижной фазами:

$$m_s = [X_s]V_s = K_1[X_m]V_s; \quad (1.28)$$

$$m_m = [X_m]V_m, \quad (1.29)$$

где  $V_s$  — объем неподвижной фазы;  $m_s$  и  $m_m$  — масса сорбата, находящаяся в неподвижной и подвижной фазах соответственно,  $m = m_s + m_m$ .

Очевидно, что поток подвижной фазы способен выносить из зоны с установившимся сорбционным равновесием лишь те молекулы  $X$ , которые в данный момент находятся в десорбированном состоянии. Следовательно, скорость перемещения зоны вещества  $X$  по колонке  $u_x$  будет меньше  $u$  во столько раз, во сколько раз  $m_m$  меньше  $m$ . Наблюдаемое экспериментально время удерживания  $t_{RX}$  связано с обсуждаемыми величинами соотношением

$$\frac{u_x}{u} = \frac{t_0}{t_{RX}} = \frac{m_m}{m} = \frac{[X_m]V_m}{K_1[X_m]V_s + [X_m]V_m} \quad (1.30)$$

Отсюда следует

$$\frac{t_R}{t_0} - 1 = K_1 \frac{V_s}{V_m} \quad (1.31) \quad k' = K_1\phi. \quad (1.32)$$

Коэффициент емкости, определенный выше, равен отношению количества вещества в неподвижной фазе к его количеству в подвижной:

$$k' = \frac{m_s}{m_m} \quad (1.33)$$

Другим важным параметром сорбента (колонки) является фазовое отношение  $\phi$  (с. 17). Из приведенных соотношений ясно, что, зная константу равновесия в идентичной в химическом отношении системе, можно в принципе рассчитать время удерживания соединения в хроматографической системе, установив тем самым прямую связь между параметрами, измеряемыми в статических и динамических условиях. К сожалению, однако, не так уж часто значения  $\phi$  достоверно известны. Пожалуй, единственный тип систем, для которых подобное прямое сопоставление осуществимо, — распределительные системы «жидкость—жидкость» с механически нанесенной неподвижной фазой. Но и они из-за ряда недостатков практического плана ушли в прошлое. Кроме того, при современном состоянии техники хроматографического эксперимента, когда выполнение однократного разделения значительно менее трудоемко, чем

определение коэффициентов распределения в статической системе, использование зависимости (1.32) для прогнозирования хроматографического поведения практически лишено смысла. Наоборот, чаще делаются попытки оценить значения коэффициентов распределения исходя из хроматографических данных.

Таким образом, хотя физический смысл коэффициента емкости вполне ясен, соотношения (1.24) — (1.33) все же носят иллюстративный характер и не так уж много дают хроматографисту-практику в плане выбора условий разделения и интерпретации наблюдаемых величин удерживания.