

5. МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВЭЖХ

5.1. АППАРАТУРА

Все узлы современного жидкостного хроматографа являются по своей сути периферическими, вспомогательными элементами по отношению к колонке, где протекает собственно физический процесс разделения. Рабочие параметры высокоэффективных колонок определяют основные технические требования, предъявляемые к ряду других элементов аппаратуры. К таким параметрам относятся в первую очередь высокое гидравлическое сопротивление и малая степень размывания хроматографических зон, а также небольшие объемы аналитических колонок для ВЭЖХ.

Сорбенты, используемые в ВЭЖХ, характеризуются высокой скоростью массопередачи, что позволяет работать при больших линейных скоростях потока подвижной фазы без снижения эффективности разделения. Это, однако, достигается главным образом за счет уменьшения размера частиц сорбента. Поэтому потенциально высокая скорость процесса разделения может быть реализована лишь в том случае, если подвижная фаза подается в колонку под достаточно высоким давлением.

С другой стороны, высокоэффективные колонки имеют значительно меньший размер, чем колонки для классической жидкостной хроматографии. Следовательно, меньше должен быть объем вводимой пробы и меньше становится объем растворителя, соответствующего хроматографическому пику. К такому же результату приводит и повышение эффективности самого разделения. Малые объемы пиков и вводимых проб определяют требования к миниатюризации детекторов и устройств ввода. Так, совершенно ясно, что детектор регистрирует сигнал, полностью адекватный процессу разделения, произошедшему в колонке, лишь если объем его чувствительного элемента значительно меньше объема пика. Из табл. 5.1, где сопоставлены некоторые характеристики, типичные для колонок различной эффективности и размеров, видно, что все варианты ВЭЖХ требуют применения давлений (при хорошей проницаемости колонок) в пределах 50—200 атм. Кроме того, рабочий объем чувствительного элемента детектора должен иметь для аналитической и скоростной хроматографии порядок $1 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-2}$ мл, а для микро-колоночной — $1 \cdot 10^{-4}$ — $1 \cdot 10^{-3}$ мл.

Таблица 5.1 Характеристики некоторых типичных хроматографических колонок

Параметр	Колоночная хроматография	ВЭЖХ			
		аналитическая	скоростная аналитическая	микроколоночная	препаративная
Размер частиц сорбента, мкм	100	5	3	5	5
Длина колонки, см	100	25	5	15	25
Внутренний диаметр, мм	20	4,6	4,6	1,0	21,2
Эффективность, тыс. теоретических тарелок	1	15	6	6	15
Линейная скорость подвижной фазы, см/мин	0,5	15	25	15	10

полученных значений в электрический сигнал. Система регистрации и обработки данных (РОД) в простейшем случае представляет собой самописец, регистрирующий хроматограмму в координатах время—сигнал детектора. Помимо самописца (или вместо него) могут использоваться специализированные вычислительные устройства различных классов либо даже универсальные мини-ЭВМ.

Другие узлы, изображенные на схеме пунктирными линиями, существенно повышают производительность оборудования, а иногда позволяют получить результаты, принципиально недостижимые на простейших системах.

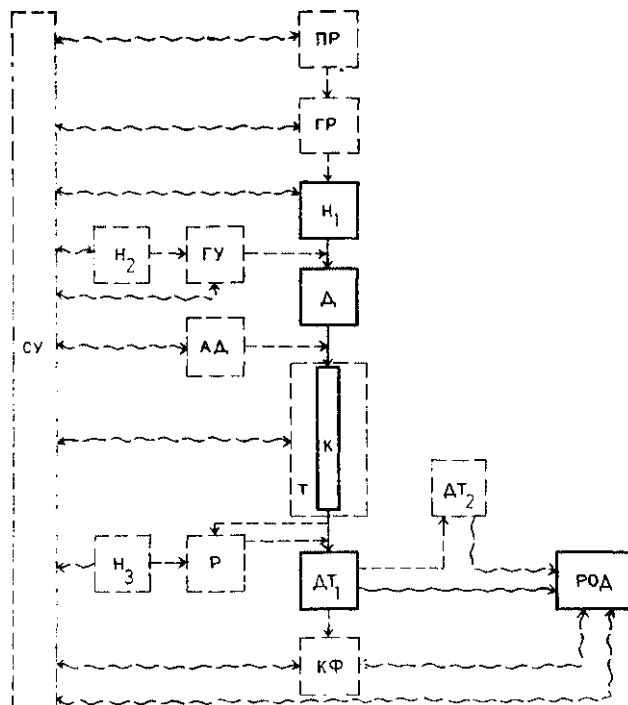


Рис. 5.1. Блок-схема современного хроматографа: ПР — узел подготовки растворителя; ГУ — узел формирования градиента; Н — насосы; Д — дозатор; АД — автоматический дозатор; К — колонка; Т — термостат; Р — реактор; ДТ — детекторы; КФ — коллектор фракций; РОД — система регистрации и обработки данных; СУ — система управления. Прямыми линиями обозначены гидравлические соединения узлов, волнистыми — электрические.

Устройства подготовки растворителей (ПР) выполняют функции фильтрования и дегазации подвижной фазы. Градиентное устройство (ГУ) обеспечивает изменение состава подвижной фазы в ходе разделения по заданному закону. Автоматические дозаторы (АД) дают возможность организовать последовательный ввод и анализ больших серий однотипных образцов. Термостат (Т) обеспечивает в необходимых случаях поддержание строго постоянной температуры колонки. Для некоторых соединений трудно подобрать подходящий способ

время выпускаются за рубежом и в СССР специальной квалификации «для жидкостной хроматографии». Тем не менее перед использованием они должны быть подвергнуты определенной подготовке, включающей в себя следующие операции: фильтрацию; дегазацию; формирование градиента состава.

Фильтрация растворителей перед их подачей в насос совершенно необходимо, так как механические примеси могут нарушить работу клапанов насоса, что выразится в непостоянстве подачи растворителя. Особо твердые частицы способны повредить уплотнения насоса и дозатора. Кроме того, твердые частицы, попадая на входной фильтр колонки, задерживаются на нем, и со временем их накопление ведет к серьезному увеличению сопротивления колонки потоку.

Обычно фильтры являются составной частью аппаратуры и изготавливаются из пористой нержавеющей стали. Они могут быть погружными, т. е. располагаться непосредственно в резервуаре для подвижной фазы, либо проточными. Размер пор, как правило, 2—5 мкм. Естественно, перед использованием в системе растворитель должен быть профильтрован и через обычный стеклянный пористый фильтр для удаления наиболее крупных механических примесей. Схематично конструкция некоторых типов фильтров отражена на рис. 5.2, а, б.

Растворитель — не единственный источник механических загрязнений в системе. С течением времени изнашиваются уплотнения насоса и дозатора, и продукты износа этих узлов могут также накапливаться на входном фильтре колонки. Поэтому дополнительные фильтрующие элементы помещают иногда между насосом и дозатором (рис. 5.2, в) или между дозатором и колонкой (рис. 5.2, г). В последнем случае одновременно обеспечивается защита колонки от загрязнений, попадающих с исследуемым образцом.

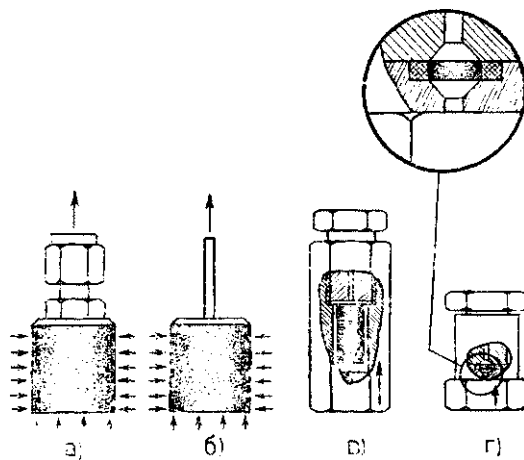


Рис. 5.2. Типичные конструкции фильтров для установки: а, б — в резервуаре подвижной фазы; в — перед дозатором; г — перед колонкой.

Газы воздуха, растворенные в подвижной фазе, могут стать причиной нарушений работы насосов и детекторов. Так, в период заполнения в рабочей камере насоса возникает разрежение, что способствует выделению пузырьков газа. При последующем периоде нагнетания они препятствуют работе клапанов насоса, и фактическая подача растворителя оказывается меньше заданной. Кроме того, резко возрастают пульсации потока подвижной фазы. Помимо этой части прибора выделение газов возможно и в детекторе при быстром переходе подвижной фазы из колонки, где давление повышено, к ячейке, где оно близко к атмосферному. Пузырьки накапливаются в ячейке, их рост и периодическое вымывание из нее обычно приводят к появлению на диаграммной ленте зигзагообразной линии. В связи с этим дегазацию подвижных фаз можно считать крайне желательной.

Устройства для дегазации растворителей могут быть основаны на различных физических принципах и использоваться как в виде отдельных приборов, так и в виде узлов, непосредственно включенных в хроматографическую систему.

Дегазация может достигаться при резком уменьшении давления, под которым находится жидкость. Такой принцип использовался в получившем в свое время распространение хроматографе фирмы «Дюпон», мод. 830. Этот прибор снабжен пневмоусилительным насосом с объемом жидкостной камеры 70 мл. С помощью системы кранов перед работой осуществляется многократная циркуляция подвижной фазы между насосом и резервуаром. При резком всасывании растворителя из резервуара в насос растворенные газы воздуха выделяются в виде пузырей. При вытеснении растворителя назад в резервуар он увлекает за собой выделившуюся парогазовую фазу. Интересно, что для дегазации используется то самое физическое явление, которое в значительной мере осложняет работу возвратно-поступательных плунжерных насосов.

Эффективное удаление газов из растворителей может быть достигнуто их выдерживанием под вакуумом. Обычно для этого достаточно в течение 3—10 мин перемешивать растворитель с помощью магнитной мешалки в колбе Бунзена, подключенной к водоструйному насосу. В некоторых случаях возникают затруднения при определении момента окончания дегазации, так как пузырьки газа постепенно сменяются паровыми пузырями при вскипании растворителя. Опыт показывает, что при дегазации в колбе Бунзена газовые пузырьки более многочисленны и меньше размером. Увеличение размеров и уменьшение числа пузырей свидетельствуют о том, что дегазация переходит в кипение.

Иногда для дегазации рекомендуют нагревать растворитель до температуры, близкой к температуре кипения.

Нередко полезным оказывается выдерживание растворителя в ультразвуковой ванне или интенсивная продувка резервуара гелием.

Многие дегазированные растворители способны с большой легкостью вновь поглощать газы воздуха, поэтому дегазация должна выполняться в сосуде, который используется в качестве резервуара подвижной фазы в хроматографе. Желательно дегазировать индивидуальные растворители, так как смеси при этой процедуре могут в некоторой степени изменять свой состав. С другой стороны, опыт показывает, что при смешении индивидуальных растворителей в

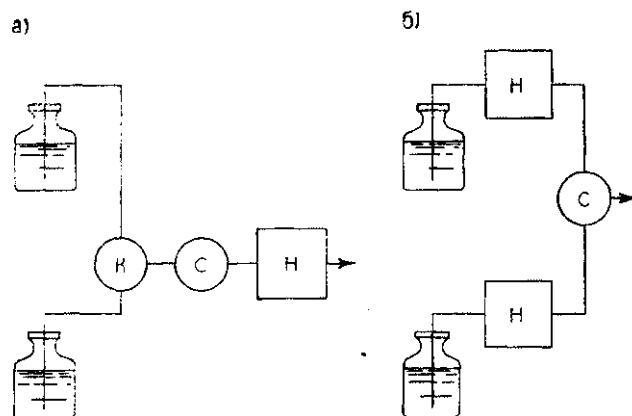


Рис. 5.3. Принципы формирования градиента: *а* — в области низкого давления; *б* — в области высокого давления. К — клапан; С — смеситель; Н — насосы.

Для изменения состава подвижной фазы в ходе анализа применяются градиентные устройства. При этом возможны три основных способа генерирования градиента: в области низкого и высокого давления, а также в шприцевом насосе. В первом случае (рис. 5.3,а) два или большее число растворителей подаются каждый из своего отдельного резервуара в клапанное устройство, которое управляется электронным программатором либо микропроцессором. С его помощью на входе в смеситель генерируются периодические импульсы каждого из компонентов подвижной фазы. Относительная продолжительность импульсов соответствует относительной концентрации компонентов подвижной фазы. Смеситель обычно представляет собой камеру из нержавеющей стали, внутри которой располагается мешалка, приводимая во вращение расположенным снаружи магнитом. После смесителя подвижная фаза поступает на вход насоса и далее в систему.

При создании градиента в области высокого давления (рис. 5.3,б) хроматограф должен содержать два или более насосов. Каждый из компонентов поступает в свой насос. Скорость объемной подачи растворителей каждым из насосов в течение цикла изменяется с помощью электронного программатора или микропроцессорного устройства таким образом, чтобы: а) суммарная подача оставалась все время постоянной; б) относительное содержание компонентов подвижной фазы в смеси изменялось по заданному закону. Далее потоки от насосов поступают в смеситель и дозирующее устройство.

Формирование градиента в камере шприцевого насоса является, пожалуй, простейшим, хотя и наименее точным способом. К тому же он пригоден лишь для создания ступенчатых градиентов. Принцип его в том, что в режиме заполнения в насос подаются порции растворителя последовательно изменяющегося состава. При соответствующих предосторожностях можно избежать их смешения; когда насос начинает работать в режиме подачи, слои растворителя вытесняются в колонку в обратной последовательности.

Некоторые характеристики систем формирования градиента сопоставлены в табл. 5.2.

Таблица 5.2

Сравнительные характеристики систем формирования градиента

Тип градиентного устройства	Точность формирования смеси растворителей в начале и конце градиента	Пригодность для работы с микроколонками	Стоимость	Точность поддержания постоянства потока
Устройства низкого давления	Высокая	Плохая	Умеренная	Высокая
Устройства высокого давления	Хорошая с шприцевыми насосами; плохая с плунжерными	Удовлетворительная	Высокая	Удовлетворительная
Формирование градиента в шприцевом насосе	Плохая	Хорошая	Низкая	Высокая

5.1.2. НАСОСЫ

К наиболее важным техническим характеристикам насосов для ВЭЖХ относятся: диапазон объемной подачи; максимальное рабочее давление; воспроизводимость объемной подачи; диапазон пульсаций подачи растворителя.

В начальный период развития приборостроения для жидкостной хроматографии применялись разнообразные по принципам действия насосы, однако постепенно произошел отсев менее пригодных для ВЭЖХ конструкций, и в настоящее время используются почти исключительно насосы трех типов: шприцевые; пневмоусилительные; плунжерные возвратно-поступательные.

Хотя множество насосов первых двух типов все еще находится в эксплуатации, новые модели в подавляющем большинстве относятся к последней группе. Так, анализ конструкций, созданных в 1983—1985 гг. [10], показал, что 80% разработок основаны на плунжерном возвратно-поступательном принципе.

По характеру подачи растворителя насосы могут быть постоянной подачи и постоянного давления. К первой группе относятся шприцевые и плунжерные насосы, ко второй — пневмоусилительные. При необходимости, однако, с помощью дополнительных устройств можно обеспечить работу любой конструкции в любом необходимом режиме.



Шприцевые насосы. Принцип действия насосов этой группы изображен на рис. 5.4. Блок управления (БУ) подает на шаговый либо прецизионный синхронный двигатель (Д) команды, определяющие скорость и направление его вращения. Вращение двигателя с помощью редуктора (Р) преобразуется в перемещение поршня (П) внутри цилиндра (Ц). Работа насоса осуществляется в два цикла. В цикле заполнения клапан K_2 запирается, а клапан K_1 открывается. При этом растворитель поступает из резервуара в цилиндр. В режиме подачи клапан K_1 закрыт, а через клапан K_2 подвижная фаза поступает в дозирующее устройство.

Для насосов этого типа характерно практическое отсутствие пульсаций потока подвижной фазы в ходе работы. Диапазон объемной подачи, воспроизводимость и максимальное рабочее давление также удовлетворяют основным требованиям. Важно также, и то, что принцип шприцевого насоса хорошо сочетается с требованиями, предъявляемыми микроколоночной хроматографией. Насосом такого типа снабжен, в частности, хроматограф «Милихром», выпускаемый ПО «Научприбор» в г. Орле. Объем резервуара насоса 2,5 мл, диапазон объемной подачи 2—600 мкл/мин, максимальное рабочее давление 50 бар.

В то же время шприцевые насосы не лишены и серьезных недостатков. Главный из них — невозможность создания градиента растворителя с помощью одного насоса. Для этой цели необходимо использовать два насоса, подача которых регулируется специальным электронным блоком. Поэтому системы такого типа неизбежно относительно дороги.

При работах исследовательского характера, когда требуется относительно частая смена растворителей в хроматографе, становится существенным другой недостаток шприцевых насосов — большой расход растворителей и времени на промывку.

Пневмоусилительные насосы. Насосы этого типа обеспечивают постоянное давление на входе в колонку. Следовательно, для получения воспроизводимых величин удерживания необходимо, чтобы гидравлическое сопротивление колонки, вязкость растворителя и температура были постоянными. Принцип устройства этих насосов изображен на рис. 5.5.

Насос состоит из пневматического и жидкостного цилиндров, внутри которых перемещается сдвоенный поршень. Диаметры его частей соответствуют диаметрам цилиндров. В цикле заполнения насоса сжатый газ под давлением в несколько атмосфер подается в левую часть пневматического цилиндра (см. рис. 5.5). Поршни смещаются назад, и растворитель всасывается в жидкостный цилиндр. Когда поршень занимает крайнее правое положение, подача газа в левую часть цилиндра прекращается и начинается — в правую. Клапан (K_1) закрывается, клапан (K_2) открывается, и растворитель подается в дозатор хроматографа. Площадь поперечного сечения газового поршня A_1 во много раз превышает таковую жидкостного поршня. В результате в жидкостном цилиндре создается давление $P_{ж}$, которое прямо пропорционально давлению подаваемого газа $P_г$:

$$P_{ж} = P_г A_1 / A_2, \quad (5.1)$$

где A_1 и A_2 — площади сечения большого и малого поршней. Поскольку гидравлическое сопротивление всасывающей линии невелико, цикл заполнения длится не более нескольких секунд. Объем жидкостного цилиндра как правило достаточен для проведения нескольких

открываются, когда насос находится в фазе всасывания и подачи соответственно. Величина объемной подачи насоса определяется тремя параметрами: диаметром плунжера, его амплитудой и частотой.

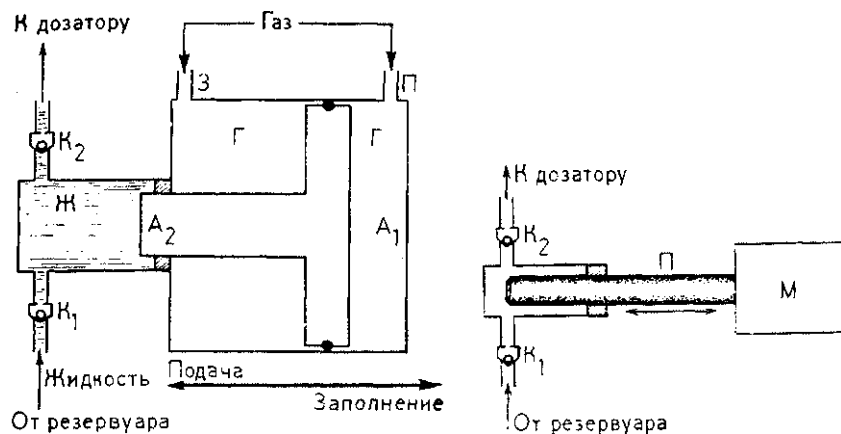
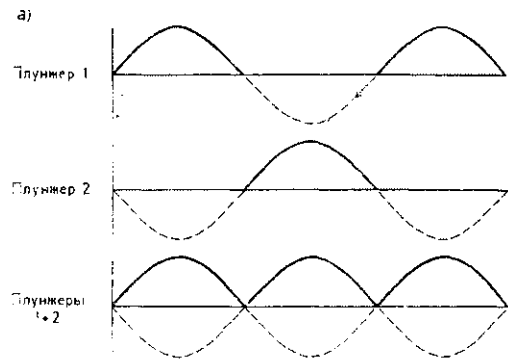


Рис. 5.5. Принципиальная схема пневмоусилительного насоса: Г — газовый цилиндр; Ж — жидкостный цилиндр; З и П — подача газа в циклах заполнения, жидкостного цилиндра и подачи жидкости соответственно.

Рис. 5.6. Принципиальная схема плунжерного возвратно-поступательного насоса.

Насосы этого типа обеспечивают постоянную объемную подачу подвижной фазы, во многих случаях они имеют возможность компенсировать сжимаемость растворителя. Максимальное рабочее давление указанных насосов обычно несколько меньше, чем у рассмотренных выше. Оно составляет 300—500 атм, чего, как правило, вполне достаточно для работы на современных колонках. Воспроизводимость объемной подачи вполне удовлетворительна при надлежащей работе клапанов. Основной недостаток насосов состоит в том, что растворитель подается в систему в виде серии последовательных импульсов.



Пулсации потока элюента являются основной причиной повышенного шума и снижения чувствительности почти всех типов детекторов, применяемых в ВЭЖХ. Способы борьбы с ними можно подразделить на две основные группы: за счет введения специальных узлов — гасителей пульсаций и за счет совершенствования конструкции самих насосов.

Простейший способ уменьшения пульсаций — уменьшение объема растворителя, подаваемого в систему

Широкое распространение получили системы сдвоенных и строенных насосов. Идея их заключается в том, что два или три идентичных плунжера приводятся в движение единым приводом, причем фазы, в которых в каждый момент находятся плунжеры, сдвинуты на 180 и 120°. Принцип такого гашения пульсаций изображен на рис. 5.7. Согласно ему, тройной насос подает растворитель уже практически без пульсаций. Тем не менее общая тенденция приборостроения в этой области такова, что более популярны двойные насосы. Видимо, улучшение характеристик, которое обеспечивает тройной насос, не оправдывает его повышенной сложности и стоимости. К тому же надежность работы таких систем, хотя бы в силу увеличенного до 6 числа клапанов, неизбежно несколько снижается.

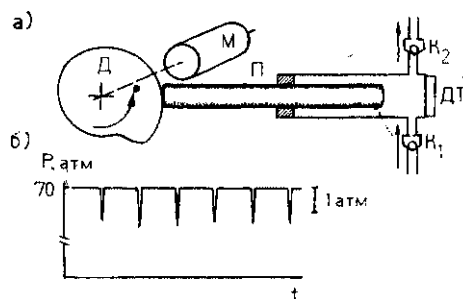
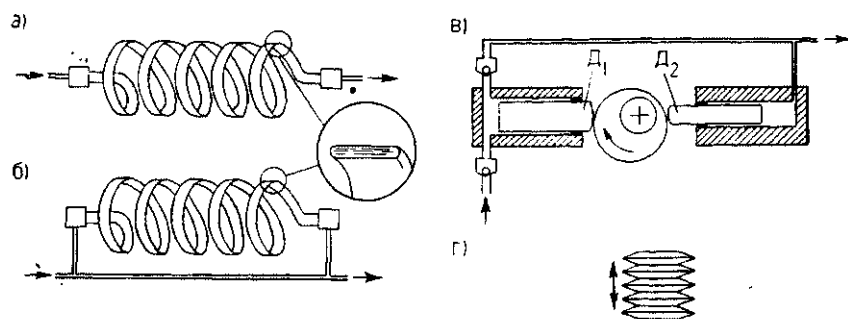


Рис. 5.8. Насос модели 112 фирмы «Бекман». а — принципиальная схема: М — двигатель; Д — кулачок; П — плунжер; ДТ — датчик давления. б — характеристика пульсаций давления.

Другой способ уменьшения пульсаций — создание специальных конструкций приводных устройств. С их помощью скорость линейного перемещения плунжера во времени изменяется по такому закону, чтобы по возможности сгладить пульсации. Например, может осуществляться электронное управление скоростью вращения мотора, чтобы плунжер ускоренно проходил нейтральные положения, а в периоды всасывания и подачи скорость его была бы почти постоянной. Того же результата можно добиться, применяя в редукторе зубчатые колеса либо кулачки специального профиля. Некоторые конструкции позволяют провести очень быстрое всасывание, за которым следует довольно длительный период беспульсационной подачи. Оба эти принципа объединены в интересной конструкции насоса модели 112 фирмы «Бекман». Принципиальная схема ее изображена на рис. 5.8. На валу шагового двигателя помещен кулачок специальной формы. Вращение его приводит в возвратно-поступательное движение плунжер. Уже сама по себе форма кулачка обеспечивает оптимальное изменение скорости движения плунжера в различных фазах цикла. Помимо этого скорость вращения мотора периодически в течение цикла изменяется, чтобы фаза всасывания происходила с максимальной скоростью. Наконец, непосредственно в головку насоса встроен датчик давления, с помощью которого на управляющую схему двигателя поступает информация, корректирующая скорость вращения. В результате фактический профиль подачи жидкой фазы в систему представляет собой прямую линию, прерываемую очень незначительными по продолжительности паузами. Падение давления в системе в момент заполнения насоса составляет всего около 1,5 атм.

Другой подход к снижению пульсаций в системе заключается в применении специальных демпфирующих устройств. Для этой цели могут использоваться спиральные трубки специального профиля из нержавеющей стали, включаемые последовательно (рис. 5.9,а) или параллельно (рис. 5.9,б) в систему между насосом и дозатором.

Демпфирующие устройства могут быть выполнены в виде вспомогательного цилиндра меньшего сечения, в котором в моменты максимальной подачи «запасается» под давлением определенное количество растворителя, подаваемого в колонку в период заполнения насоса (рис. 5.9,в). Наконец, для демпфирования можно использовать конструкцию на основе сильфона, принцип действия которой ясен из рис. 5.9,г. Простейшее устройство, выполняющее функцию демпфирования, представляет собой манометр, установленный на нагнетательной линии насоса.



Гораздо меньшие по сравнению с газовой хроматографией скорости диффузии в жидкой подвижной фазе позволяют осуществить другой принцип дозирования — с остановкой потока. Специальный клапан или кран перекрывает на время ввода пробы подачу растворителя. Давление на входе в колонку быстро снижается, и уже через несколько секунд может быть открыт доступ в дозирующую камеру, куда проба вводится обычным микрошприцем. После обратных переключений органов управления поток подвижной фазы по колонке восстанавливается и начинается процесс разделения. Принцип действия дозаторов такого типа изображен на рис. 5.10,б. Они могут использоваться при высоких давлениях — вплоть до 800 бар, не требуют применения специальных шприцев.

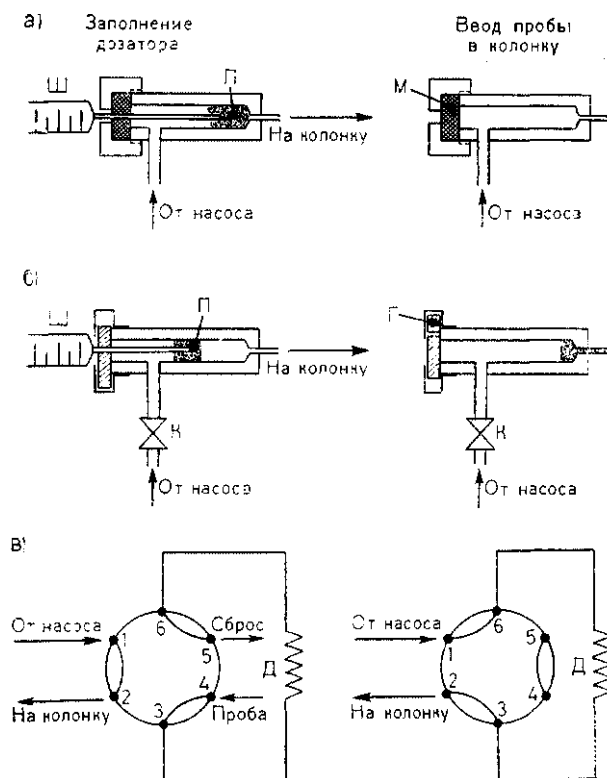


Рис. 5.10. Принципы работы дозаторов с мембраной (а), с остановкой потока (б), петлевого (в). М — самоуплотняющаяся мембрана; Ш — шприц; П — проба; К — клапан или кран; Г — герметизирующий узел; Д — дозирующая петля.

Недостаток дозаторов с остановкой потока в том, что в них почти неизбежно происходит дополнительное размывание, особенно сильно сказывающееся на пиках слабоудерживающихся соединений. Эти устройства получили некоторое распространение, однако применяются по большей части в комбинации с шприцевыми насосами, запуск которых после остановки осуще-

атмосферном давлении, что позволяет беспрепятственно заполнить дозирующую петлю с помощью шприца или любым другим способом. При повороте диска поток подвижной фазы вытесняет содержимое дозирующей петли в колонку. При этом исключаются погрешности ввода пробы, связанные с неверным отсчетом объема в микрошприце, так как вводимый в дозатор объем превышает объем дозирующей петли. Устройства этого типа могут работать при давлениях до 600 бар, их отличительной чертой является гибкость при решении различных задач. Так, при желании можно варьировать объем пробы, вводя в петлю не избыточное, а необходимое ее количество, отмеренное шприцем. Сама дозирующая петля может быть выполнена сменной, что позволяет одним и тем же дозатором вводить пробы от 10 мкл до 10 мл.

5.1.4. КОЛОНКИ

Как бы совершенны ни были все остальные части хроматографической системы, они останутся бесполезными, если качество колонки не соответствует поставленной задаче. Прогресс в технологии изготовления колонок послужил одним из факторов, которые привели к качественному скачку в уровне развития ВЭЖХ.

Некоторые типичные характеристики современных ВЭЖХ-колонок были приведены выше (см. табл. 5.1). В настоящем разделе кратко рассматриваются основные типы колонок.

Общая конструктивная схема колонки включает в себя корпус, фильтры и наконечники (рис. 5.11). Корпус представляет собой цилиндрическую трубку из нержавеющей стали, стекла или полимерных материалов; он служит емкостью для слоя сорбента. Верхний и нижний концы корпуса закрывают фильтры. Чаще всего это диски из пористой нержавеющей стали, по диаметру соответствующие наружному диаметру колонки. Диаметр пор фильтров 0,5—2 мкм, их назначение — удерживать слой сорбента в колонке. Кроме того, фильтр на входе в колонку задерживает механические примеси из подвижной фазы и образцов. Наконечники герметизируют всю колонку и служат для подключения капиллярных трубок, соединяющих колонку с дозатором и детектором. Конструкция наконечников должна быть такой, чтобы свести к минимуму внеколоночное размывание пробы и разделенных компонентов. Наконечник хорошей конструкции так формирует поток на входе в колонку, что поперечное размывание и отрицательное влияние стеночного эффекта сводятся к минимуму. Фактически в колонке работает при этом только центральная часть сорбента. Такие колонки характеризуются высокой эффективностью. Однако при указанной конструкции колонки сорбент будет легко перегружаться по мере увеличения массы вводимой пробы, и поэтому наконечники препаративных колонок призваны решать прямо противоположную задачу — распределять пробу по возможно большей части поперечного сечения. В настоящее время чаще всего применяются колонки трех типов: цельнометаллические, разборные со сменными разделительными патронами, полимерные для работы в режиме радиального сжатия.

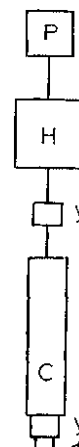
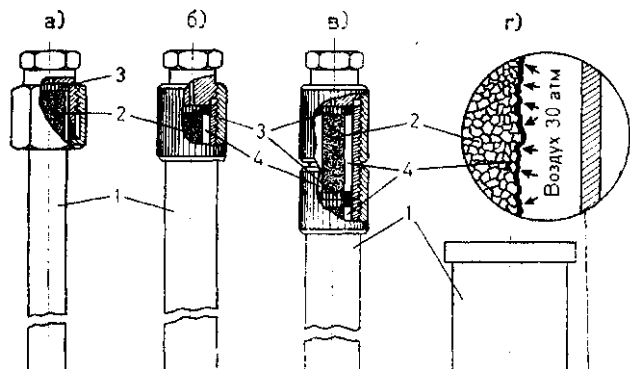
Схема устройства цельнометаллических колонок дана на Рис. 5.11.а. Эта конструкция получила наибольшее распространение в период становления ВЭЖХ и свое значение сохраняет по сей день. Формирование слоя сорбента в таких колонках происходит в момент их упаковки.

мягких полимерных материалов, просто засыпаются сухим сорбентом. Слой минимально уплотняется одним из простейших способов. Затем колонка помещается в специальную камеру, где происходит радиальное сжатие слоя. При этом все пустоты, оставшиеся после первоначального заполнения, ликвидируются и достигается достаточная однородность слоя (рис. 5.11,г). Этот принцип использован также для изготовления препаративных колонок диаметром до 40 мм. Аналитические колонки такого типа также имеют относительно большой внутренний диаметр (8—10 мм), и скорее их следует отнести к категории полупрепаративных. Сравнительная дешевизна этих колонок вряд ли компенсирует их несколько пониженную эффективность.

Промышленный выпуск заполненных аналитических и препаративных колонок для ВЭЖХ налажен многими фирмами, и, по-видимому, большая часть разделений в мире выполняется на колонках фабричной упаковки. В то же время соображения экономики, экспериментальной гибкости и, наконец, здоровый «спортивный интерес» заставляют многих хроматографистов осваивать методы упаковки собственных колонок. Это во всяком случае оправдано, если предстоит работать в условиях, быстро выводящих слой сорбента из строя, либо при работе с оригинальными сорбентами, синтезированными в лаборатории.

Вкратце рассмотрим принципы упаковки колонок «жесткого» типа. Установлено, что по мере уменьшения диаметра частиц способы «сухой» упаковки колонок, заключающиеся в засыпании сорбента при постоянной вибрации, становятся все менее эффективными. Уже сорбент с размером частиц 20 мкм упаковать таким образом не удастся. Для частиц меньшего размера в настоящее время применяют исключительно так называемый суспензионный способ упаковки: суспензию сорбента в подходящем растворителе быстро отфильтровывают через заполняемую колонку с установленным нижним фильтром. Принципиальная схема прибора для заполнения колонок приведена на рис. 5.12. Она состоит из насоса высокого давления (Н), резервуара с растворителем (Р), емкости для суспензии (С), направляющей форколонки, к которой подключается заполняемая колонка. Перед началом работы резервуар заполняется растворителем, колонка присоединяется к форколонке и также заполняется растворителем.

присоединяется к форколонке и заполняется приготовленной суспензией. После этого



При давлении 500—1000 атм фильтрование суспензии завершается в течение нескольких секунд, после чего через колонку прокачивают 50—200 объемов растворителя для так называемой «доупаковки».

Основные факторы, определяющие эффективность получаемых колонок, следующие: качество сорбента; выбор растворителя для приготовления суспензии; качество внутренней поверхности колонки; концентрация суспензии; выбор растворителя для «доупаковки».

Технологии заполнения колонок посвящена довольно обширная литература, однако выводы и рекомендации, к которым приходят авторы, зачастую противоречивы. Ясно, что конечный результат определяется сложным взаимодействием множества факторов и получение хороших результатов требует немалого опыта. Тем не менее практика показывает, что после некоторой оптимизации режима упаковки колонок данной геометрии сорбентом определенной марки можно получить колонки эффективностью 5000—10000 теоретических тарелок. Этот показатель примерно в два раза хуже, чем у колонок, упакованных в производственных условиях, однако и на таких самодельных колонках можно уже решать большинство задач.

Суспензия сорбента должна быть достаточно устойчивой, и это обстоятельство часто является решающим при выборе растворителя. Желаемой устойчивости можно достичь, используя смесь растворителей, обладающую плотностью, близкой к плотности сорбента. С этой целью используют бинарные смеси растворителей, содержащие бромистый метилен, йодистый метил либо другие галогенуглеводороды большой плотности. Второй растворитель имеет значительно меньшую плотность, и их соотношение выбирается таким, чтобы частицы сорбента не оседали из суспензии в течение 10—15 мин.

Другой путь стабилизации суспензии — применение вязких растворителей: например, бутанола, пропанола или этиленгликоля. Требование стабильности суспензии в целом доминирует в литературе. Однако в ряде случаев хорошие результаты были получены при особо быстрой упаковке с применением малоустойчивых суспензий в невязких и легких растворителях. Помимо стабилизирующего действия на суспензию растворитель должен обладать достаточным средством к частицам сорбента, чтобы препятствовать их агрегации. Несмотря на то что сорбенты промышленного выпуска обычно достаточно хорошо фракционированы, при их хранении и транспортировке может образоваться некоторое количество «пыли» — частиц с диаметром во много раз меньше номинального. Наличие «пыли» даже в относительно небольшом количестве может отрицательно сказаться на проницаемости колонки. Поэтому перед употреблением сорбент следует дополнительно очистить, проведя несколько раз его суспендирование в подходящем растворителе (ацетон, гексан) и декантацию взвеси пыли после оседания основного количества материала.

В качестве материала колонок чаще всего используют трубки из нержавеющей стали. Для получения хороших результатов важно качество внутренней поверхности трубки. Обычным трубкам присуща шероховатость внутренней поверхности, сопоставимая с размером зерна сорбента, поэтому для получения хороших колонок они малопригодны и требуют дополнительной полировки.

Относительно оптимальной концентрации суспензии мнения столь же разноречивы, как и относительно выбора суспендирующей среды. Хорошие результаты получены и при концентрации 2% и при концентрации 30%, но чаще всего в пределах 5—15%

высокоэффективных колонок. В настоящее время для большинства детекторов разработаны ячейки объемом 0,01 —10 мкл, отвечающие всем требованиям при работе с колонками различного диаметра.

Физические принципы, лежащие в основе различных методов детектирования, детально описаны в специальной литературе, посвященной соответствующим методам анализа, и потому здесь не рассматриваются.

Важнейшая характеристика детектора — его чувствительность. Способы ее выражения могут быть различными. При этом нужно различать чувствительность детектора как физического прибора, чувствительность хроматографа к данному соединению в данных условиях разделения и детектирования и, наконец, чувствительность аналитической методики в целом.

Чувствительность детектора может быть примерно одинаковой для веществ различной химической природы, но может и сильно различаться, иногда даже для близких соединений. В первом случае говорят о неселективном детектировании, во втором — о селективном. Часто селективность детектора имеет не меньшее значение, чем чувствительность, причем в зависимости от характера конкретной аналитической проблемы селективность может оказаться как достоинством, так и недостатком. Так, если разделение преследует цель дать общий обзор состава исследуемого объекта, предпочтение должно быть отдано неселективному детектору. В другой ситуации, когда требуется определить лишь одно соединение на фоне сложной смеси, удобно воспользоваться селективным детектором. Он поможет решить проблему, даже если изучаемая смесь столь сложна, что полное ее разделение невозможно. Такого рода задачи довольно типичны для биомедицинского применения жидкостной хроматографии. Основные характеристики наиболее распространенных типов детекторов даны в табл. 5.3.

Таблица 5.3

Детекторы для ВЭЖХ

Детектор	Измеряемое свойство элюата	Ориентировочная чувствительность, мг в однократно вводимой пробе	Селективность
Фотометр (УФ и видимой области)	Оптическая плотность при фиксированной длине волн	10^{-10}	Высокая
Спектрофотометр (УФ и видимой области)	Оптическая плотность при избираемой оператором длине (длинах) волн	10^{-9}	Высокая
Рефрактометр	Разность показателей преломления	10^{-6}	Малая

Простейшее устройство для регистрации сигнала детектора — обычный потенциометрический самописец, с помощью которого хроматограмма изображается в координатах «время — сигнал детектора» подобно приведенной на рис. 1.2. Она содержит, хотя и в неявной форме, всю новую информацию об изученном объекте, однако ее необходимо перевести в форму, пригодную для использования.

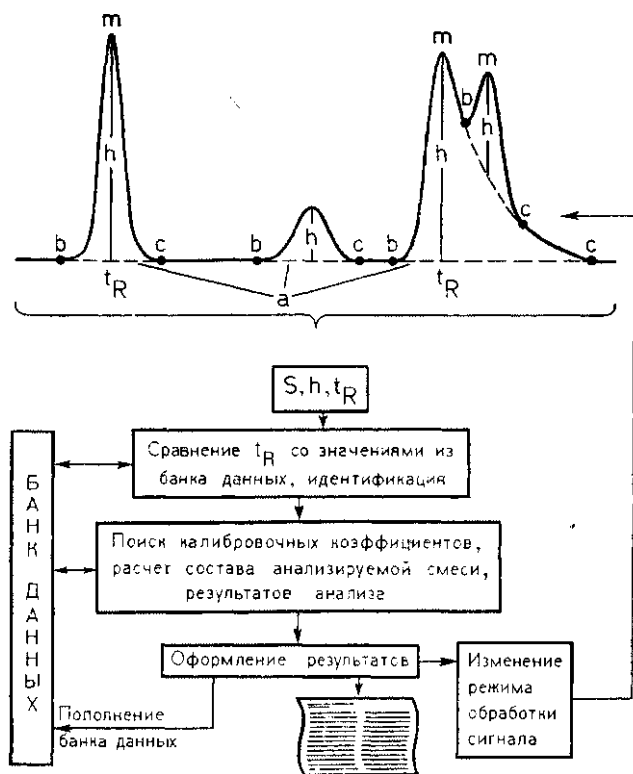


Рис. 5.13. Принципиальная схема обработки хроматограмм.

Все проводимые при этом операции могут выполняться вручную либо с помощью средств автоматизации различных классов. Ручная и автоматизированная обработки данных содержат много общих операций, однако отличаются по способу измерения площади пика. Последняя при ручной обработке измеряется как произведение высоты пика на ширину на половине высоты, а при автоматизированной — методом численного интегрирования. Операции, выполняемые при обработке хроматограмм:

- проведение базовой линии (рис. 5.13,а);
- выявление моментов начала (*b*) и конца (*c*) пиков;

коэффициенты служат для расчета состава исследуемой смеси. На долю оператора обычно остаются лишь функции контроля и оптимизации параметров интегрирования, а также оформления результатов. Многие современные модели одновременно дают и графическое изображение хроматограммы.

Вычислительные машины позволяют практически беспредельно расширять круг операций с полученными данными. На их базе можно организовывать большие банки данных, проводить изощренный статистический анализ результатов множества определений, автоматический поиск оптимальных условий. Одна и та же хроматограмма может обрабатываться многократно, появляется возможность эффективного диалога с оператором, учета его опыта и интуиции. Кроме того, универсальные мини-ЭВМ способны взять на себя функции управления всеми узлами хроматографа.

5.2. РАБОТА С РАСТВОРИТЕЛЯМИ

Основные требования к используемым растворителям изложены выше (см. главу 3). Здесь рассмотрим дополнительно отдельные практические приемы, которые можно рекомендовать для повышения надежности работы всей хроматографической системы.

Фильтрация растворителей. Основной фильтр подвижной фазы, имеющийся в каждом приборе, расположен во всасывающей линии насосной системы. Для нормальной работы насосов необходимо, чтобы сопротивление этой линии было минимальным, в противном случае при всасывании возможно образование паровых пузырей и нарушение работы клапанов. Поэтому поверхность используемых фильтров довольно большая. Для улучшения работы насоса иногда рекомендуют размещать резервуары с подвижной фазой на несколько десятков сантиметров выше насоса. С течением времени фильтры засоряются, их сопротивление увеличивается, возрастает вероятность нарушений работы насоса. Чтобы продлить срок непрерывной службы встроенного в прибор фильтра, необходимо предварительно фильтровать все растворители, помещаемые в резервуар, через материалы с размером пор 2—5 мкм.

Оценить состояние всасывающего фильтра хроматографа можно следующим образом. К выходу насоса присоединяют отрезок капилляра длиной 40—60 см и внутренним диаметром 0,25—0,5 мм. Конец капилляра размещают на 40—60 см ниже уровня подвижной фазы в резервуарах. Засасывают (с помощью вакуума, шприца, резиновой груши) в капилляр жидкость из резервуара. После отсоединения источника вакуума при остановленном насосе подвижная фаза должна продолжать самопроизвольно вытекать из капилляра со скоростью не менее 0,5 мл/мин. Меньшая скорость свидетельствует о засорении фильтра. Для его очистки можно рекомендовать следующую процедуру. Фильтр отсоединяют от системы и продувают сжатым воздухом в направлении, противоположном рабочему. Затем помещают в стакан, заливают ацетоном и устанавливают стакан в ультразвуковую ванну. Через 10 мин ацетон заменяют дистиллированной водой, затем 30%-ной азотной кислотой. После 10-минутной выдержки в ультразвуковой ванне фильтр отмывают от азотной кислоты дистиллированной водой до pH 5. После этого он готов к

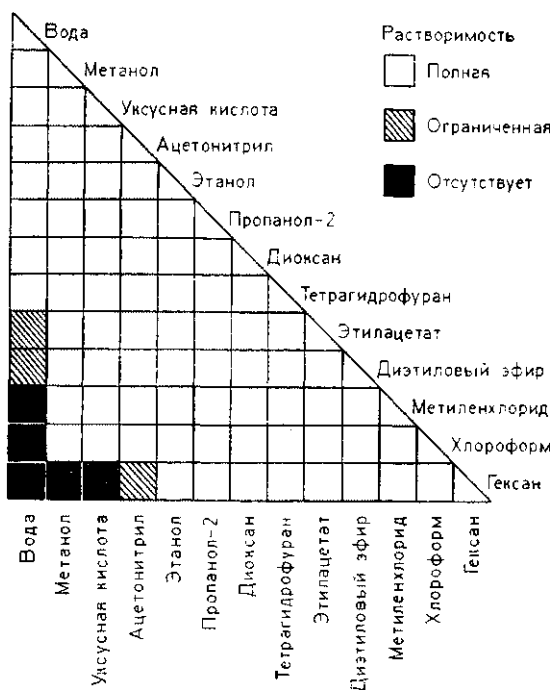


Рис. 5.14. Взаимная совместимость некоторых часто применяемых растворителей.

Повторное использование растворителей. Чаще всего подвижную фазу используют однократно, после чего уничтожают или, того хуже, выливают в канализацию. По нашему мнению, такая практика не оправдана ни экономически, ни экологически, ни даже с точки зрения хроматографии как таковой. Можно предложить два пути повторного использования растворителей — регенерацию и рециркуляцию. При регенерации элюат после детектора собирают и порциями подвергают перегонке. В результате получают смесь растворителей, несколько отличающуюся по составу от первоначального элюента. Проанализировав ее (например, методом ГЖХ), можно рассчитать, сколько и какого растворителя необходимо добавить, чтобы получить подвижную фазу первоначального состава.

преимущественно для подготовки элюентов для препаративной ВЭЖХ.

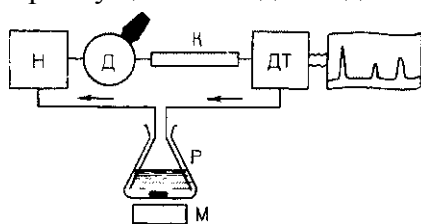


Рис. 5.15. Схема циркуляционного использования подвижной фазы: Н — насос; Д — дозатор; К — колонка; ДТ — детектор; Р — резервуар; М — магнитная мешалка.

При аналитической ВЭЖХ в изократическом режиме практически проще воспользоваться приемом рециркуляции. Схема циркуляционного использования подвижной фазы приведена на рис. 5.15. После детектора элюат возвращается в резервуар, где осуществляется его перемешивание с помощью магнитной мешалки. Такой прием можно всячески рекомендовать для проведения серийных анализов. Легко показать, что в этом случае никакого существенного загрязнения колонки не происходит: ведь в элюент попадают только те соединения, которые уже колонку прошли и, следовательно, сорбируются достаточно слабо. По этой же причине и ввиду большого разбавления компонентов пробы есть все основания пренебречь изменением сорбционных свойств колонки в результате динамического модифицирования. Наконец, такой прием вполне допустим и с точки зрения детектирования. Допустим, хроматограмма содержит n пиков, имеющих высоту 100% шкалы

Фосфатные буферные растворы могут служить средой для размножения микроорганизмов, потому их рекомендуется хранить в холодильнике. По этой же причине не следует оставлять неработающие колонки в контакте с этими растворами.

Нержавеющая сталь, из которой изготавливаются почти все детали хроматографического оборудования, вполне устойчива в контакте с подавляющим большинством буферных растворов и солей, применяемых в ВЭЖХ. Исключение составляют формиаты и галогениды, обладающие заметной коррозионной активностью.

При приготовлении подвижных фаз для ион-парной, обращенно-фазовой или ионообменной хроматографии получение необходимой молярной концентрации компонентов не вызывает затруднений, в то время как установка необходимого значения рН водно-органических элюентов может быть связана с затруднениями. Поэтому принято указывать значения рН не для элюента в целом, а для его водной части, до смешения с органическим растворителем. Следует одновременно иметь в виду, что прибавление к водному буферу органического растворителя может увеличить «кажущееся значение рН» на 1—2 единицы, в результате чего смешанный водно-органический элюент может оказаться довольно агрессивным по отношению к химически модифицированным силикагелям.

5.3. РАБОТА С КОЛОНКАМИ

Концевые фитинги. Фитинги современных колонок весьма просты по конструкции и в эксплуатации (см. рис. 5.11). Работа с ними не требует особых навыков, и герметичность, необходимая при давлении до 500 атм, достигается легким затягиванием уплотнения с помощью двух ключей. Проблемы с уплотнениями колонок возникают чаще всего из-за их износа при частой сборке, разборке и демонтаже. В ходе эксплуатации фитингов до поры до времени герметизация не требует значительных усилий. Однако по мере износа необходимое усилие затягивания возрастает, и с этого момента деформация уплотнения ускоряется, быстро приближается и момент его необратимого выхода из строя. Во избежание чрезмерного «перетягивания» уплотнений и быстрого их выхода из строя можно рекомендовать сборку всех коммуникаций прибора, находящихся под давлением, при включенном насосе. Каждое уплотнение при этом затягивают постепенно, в несколько приемов, только до устранения течи.

Фильтры. Фильтры современных колонок представляют собой диски из пористой нержавеющей стали. Их толщина обычно 0,5—1 мм, диаметр равен наружному диаметру колонки. Размер пор колеблется от 0,5—2 мкм на выходе колонки до 2—5 мкм на входе. Как правило, фильтры на выходе безотказно функционируют в течение всего периода эксплуатации колонки, фильтры на входе в колонку засоряются значительно чаще. Удобнее всего иметь сменные фильтры. Для замены фильтра входной фитинг разбирают, извлекают использованный фильтр и устанавливают новый. Использованный фильтр затем можно промыть подобно тому, как описано выше для фильтра подвижной фазы.

Стабильность колонок. Силикагель и химически модифицированные силикагели вполне устойчивы в органических растворителях и водных подвижных фазах с рН 2,0—7,5. Тем не менее даже

системы. Однако нередко заметного загрязнения фильтра нет, а верхняя часть слоя покрыта плотным слоем столообразного осадка. В этих случаях опять-таки замена верхних 0,5—1 мм слоя может помочь решить проблему.

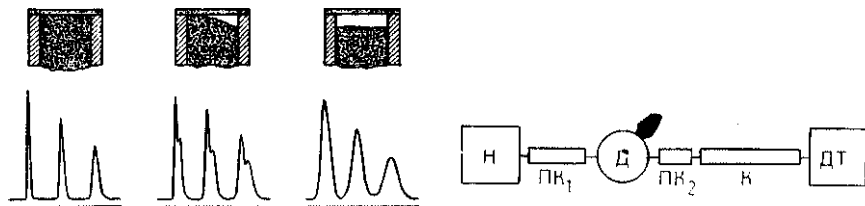


Рис. 5.16. Форма слоя сорбента на входе в колонку и соответствующие характерные хроматограммы: а — нормальный слой; б — несимметричная полость; в — симметричная полость.

Рис. 5.17. Варианты расположения защитных форколонок ПК₁, ПК₂: Н — насос; Д — дозатор; К — колонка; ДТ — детектор.

Предколонки (форколонки) — одно из средств профилактики описанных нарушений работы колонок. Они могут располагаться в двух точках хроматографической системы (рис. 5.17). Предколонки (ПК₁) между насосом и инжектором заполняются обычно пелликулярными сорбентами, родственными по химическому типу тем материалам, которыми заполняется основная колонка (К). Если подвижная фаза обладает способностью растворять сорбент, этот процесс происходит в предколонке (ПК₁). В результате подвижная фаза насыщается продуктами деструкции сорбента и, подходя к основной колонке (К), почти полностью теряет свою растворяющую способность. Все отрицательные явления, подобные изображенным на рис. 5.16, в этом случае отмечаются в предколонке, однако это несущественно, так как на ней разделение не происходит.

Предколонки (ПК₂), расположенные между дозатором и основной колонкой (защитные колонки), участвуют в разделении, поэтому часто их конструкция и технология заполнения в общем, повторяют таковые высокоэффективных колонок. Вместе с тем в них можно использовать и более крупнозернистые и пелликулярные материалы. Если Предколонки упакованы тщательно, они не вызывают сколько-нибудь серьезного снижения эффективности системы, но зато позволяют защитить основную колонку от разрушающего и засоряющего воздействия подвижной фазы и разделяемых смесей.

Промывка и регенерация колонок. В типичных условиях проявительной ВЭЖХ колонка постоянно промывается потоком подвижной фазы, поэтому необходимость ее специальной очистки и регенерации возникает редко, лишь в особенно неблагоприятных случаях. Для промывки и регенерации используют последовательность растворителей возрастающей элюирующей силы. Объем каждого из них равен примерно десятикратному геометрическому объему колонки. Для колонок с силикагелем, работающих в нормально-фазовом режиме, можно рекомендовать последовательность: хлороформ—этил ацетат—ацетон—этанол— вода—этанол—ацетон—этилацетат—хлороформ. При работе с алкилсиликагелями в обращенно-фазовом режиме последовательность такова: вода—метанол—

- перевод образца в растворитель, совместимый с используемой хроматографической системой;
- удаление компонентов и механических примесей, отрицательно влияющих на работу хроматографа и колонки;
- предварительное отделение таких компонентов, которые не представляют интереса либо затрудняют анализ;
- обогащение пробы определяемыми компонентами;
- перевод компонентов пробы в форму, способствующую селективному разделению;
- перевод компонентов пробы в форму, способствующую чувствительному и селективному детектированию.

Избираемый способ подготовки проб должен соответствовать характеру аналитической задачи. При исследовании реакционных смесей, готовых продуктов или лекарственных форм подготовка проб обычно сравнительно проста. Как правило, навеску исследуемого образца растворяют в определенном количестве растворителя и отфильтровывают от механических примесей. В качестве растворителя лучше всего использовать подвижную фазу. Это обеспечивает наилучшую воспроизводимость результатов и форму хроматографических пиков. В отдельных случаях возникает необходимость растворения образца в подвижной фазе меньшей элюирующей силы, что допустимо, хотя воспроизводимость анализа может оказаться несколько ухудшенной. Запрещается использовать для растворения проб смеси, обладающие большей элюирующей силой, чем подвижная фаза. В результате смешения такого растворителя с элюентом в колонке форма хроматографического пика окажется искаженной, возможно также выпадение компонентов пробы в осадок и засорение фильтра на входе в колонку. Силикагель и химически модифицированные силикагели неустойчивы при $\text{pH} > 8$, поэтому растворы, имеющие хотя бы слабощелочную реакцию, необходимо подкислить перед введением в колонку.

При работе с образцами особо сложного состава (например, биологическими жидкостями) подготовка к анализу, как правило, многостадийная. Она может включать операции по осаждению, центрифугированию, фильтрованию, экстракции. При этом успех анализа в большей степени зависит от качества подготовки проб, чем от выбора условий хроматографирования. В последние годы ряд фирм освоили выпуск пластмассовых хроматографических патронов для очистки и концентрирования образцов. Эти патроны (объем 1—20 мл) заполняются крупнозернистыми сорбентами, по химии поверхности совершенно аналогичными тем сорбентам, которые используются в ВЭЖХ. Принцип их использования следующий. Изучаемый объект растворяют в растворителе, обладающем незначительной элюирующей силой по отношению к анализируемым веществам. Полученный раствор пропускают через патрон, при этом более подвижные компоненты пробы в нем не задерживаются, а определяемые соединения накапливаются в верхней части слоя сорбента. Таким образом через патрон можно пропустить довольно большой объем образца, во много раз превышающий объем сорбента в нем. По окончании этой операции колонку промывают небольшим объемом растворителя, обладающего значительной элюирующей силой по отношению к определяемым соединениям ($k' \sim 10^{-1}$). В результате такой процедуры из образца

мл диметилформамида. Нагревают раствор в течение 1 ч при 60°C. Образец непосредственно можно вводить в хроматографическую колонку с обращенно-фазовым сорбентом.

2. *p*-Нитробензиловые эфиры карбоновых кислот Растворяют 3 мкмоль карбоновой кислоты и 9 мкмоль нитробензил-*N,N'*-диизопропилмочевины в 250 мкл метиленхлорида в реакционном сосуде. Нагревают до 80°C и выдерживают 2 ч. Реакционную смесь можно непосредственно анализировать в режиме нормально-фазовой хроматографии, или после продувки в токе азота и замены растворителя образец можно анализировать в обращенно-фазовом режиме.

3. 2,4-Динитрофенилгидразоны карбонильных соединений Растворяют 10 мкмоль образца в 0,5 мл метанола, подкисляют одной каплей концентрированной соляной кислоты. Растворяют 15 мкмоль 2,4-динитрофенилгидразина в 0,5 мл метанола. Смешивают два раствора и нагревают в течение нескольких минут при 50°C до завершения реакции.

4. *p*-Нитробензилоксимы карбонильных соединений. Растворяют 1 мкмоль образца и 5 мкмоль *p*-нитробензилоксиамина и 50 мкл пиридина. Нагревают реакционную смесь при 60°C в течение 30 мин. Упаривают пиридин током азота и растворяют осадок в метиленхлориде, промывают разбавленным раствором соляной кислоты перед введением образца в хроматографическую колонку.

5. УФ-поглощающие эфиры спиртов Растворяют 10 мкмоль спирта, 50 мкмоль подходящего фенацил- или бензоилбромида и 10 мкмоль пиридина в метиленхлориде. Реакционную смесь выдерживают в течение 1 ч при 55°C. Упаривают пиридин и метиленхлорид в токе азота и гидролизуют избыток реагента одной или двумя каплями 2 н. соляной кислоты. Удаляют избыток кислоты промыванием 1 %-ным раствором карбоната натрия. Осадок растворяют в подходящем растворителе и хроматографируют.

6. 2,4-Динитрофенильные производные аминов. К 0,2 мл 3%-ного раствора 1-фтор-2,4-динитробензола в диоксане добавляют раствор образца в 1,5 мл 1%-ного водного тетрабората натрия. В течение 25 мин нагревают раствор при 60°C, затем добавляют 0,2 мл 2 М раствора гидроокиси натрия, выдерживают 15 мин. Охлаждают раствор и встряхивают с 1 мл циклогексана. Экстрагируют слой циклогексана 0,1 М раствором карбоната натрия (3X2 мл). Органическую фазу можно непосредственно хроматографировать в нормально-фазовом режиме.

5.5. ВЫБОР УСЛОВИЙ ЭКСПЕРИМЕНТА

5.5.1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

Желательно еще до начала работы обобщить литературные сведения о решении стоящей задачи с помощью ВЭЖХ и другими методами. Они, несомненно, окажут большую помощь, позволят справиться с проблемой за более короткое время. В то же время значение этой информации не следует переоценивать, и не всегда следует также пытаться слепо воспроизвести опубликованный

применительно к конкретным условиям и задачам. К счастью, возможности такой модификации за счет варьирования тех или иных параметров в ВЭЖХ необычайно широки.

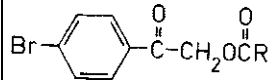
5.5.2. УСЛОВИЯ РАЗДЕЛЕНИЯ

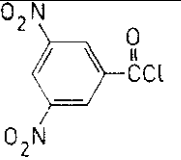
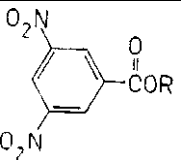
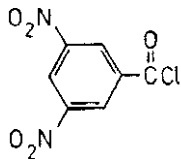
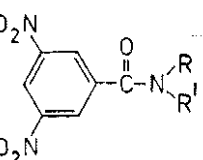
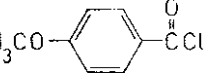
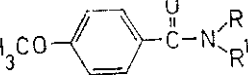
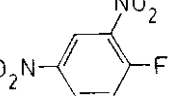
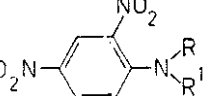
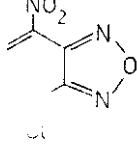
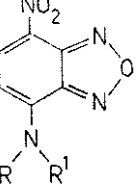
В настоящее время в методиках разделения обычно указывают такие простые и физически наглядные параметры, как геометрические размеры колонок, объемный расход подвижной фазы, время удерживания. Однако основной результат хроматографического процесса — разделение — напрямую связан не с этими параметрами, а со специфическими характеристиками термодинамической и кинетической природы, в первом приближении не зависящими от геометрических характеристик хроматографической системы — коэффициентами емкости соединений, эффективностью колонки и т. п. Поэтому при описании результатов хроматографических экспериментов коэффициенты емкости, эффективность, линейная скорость подвижной фазы должны указываться наряду с приведенными выше характеристиками.

Длина колонки и эффективность. В большинстве случаев хроматографисты пользуются стандартным рядом длин колонок: 25, 15 или 10 см. В последнее время многие фирмы освоили выпуск более коротких колонок (вплоть до 3 см), заполненных особо мелкозернистыми сорбентами. Однако из теоретических основ метода ясно, что сама по себе длина колонки влияния на качество разделения не оказывает, а ее увеличение способствует увеличению продолжительности разделения. Действительно определяющим фактором является эффективность колонки, и именно ее необходимо указывать, описывая разделение. Это позволяет осознанно подходить к воспроизведению методик разделения и одновременно использовать возможности сокращения продолжительности анализа. Допустим, что, согласно опубликованной методике, разделение выполнялось на колонке длиной 25 см и эффективностью 5000 теоретических тарелок. По современным воззрениям такая колонка не может считаться высококачественной, однако примеров подобного рода в литературе, и даже новейшей, более чем достаточно. В настоящее время для получения указанной эффективности достаточно колонки длиной 10 или даже 5 см. Поэтому имеется реальная возможность, сохранив все остальные параметры опыта постоянными, воспроизвести ранее достигнутое качество разделения на более короткой колонке и за более короткое (2,5—5 раз) время.

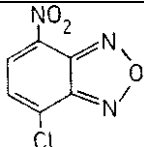
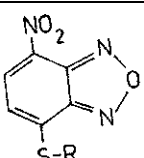
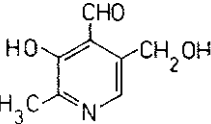
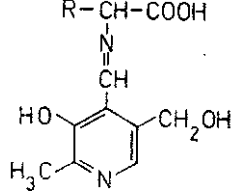
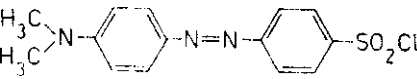
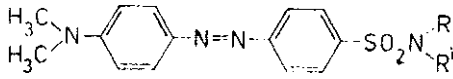
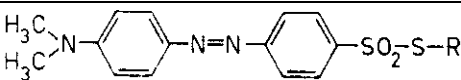
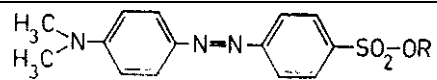
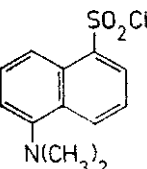
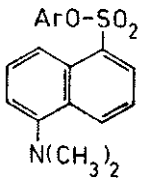
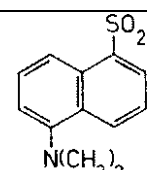
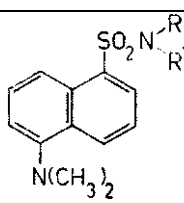
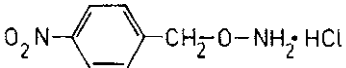
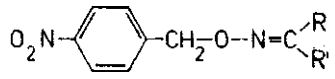
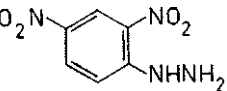
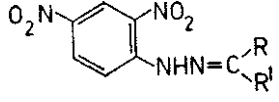
Таблица 5.4

Производные для высокоэффективной жидкостной хроматографии

Класс анализируемых	Реагент	Производное	Детектор*
1	2	3	4
Карбоновые кислоты R-COOH	 п-бромфенацилбромид		УФ (260 нм)
			Ф (360/420)

Спирты, фенолы R — OH	 3,5-динитробензоилхлорид		УФ (254 нм)
Амины R — NH — R'	 3,5-динитробензоилхлорид		УФ (254 нм)
	 п-метоксибензоилхлорид		УФ (254 нм)
	 2,Д -динитро-1-фторбензол		УФ (360 нм)
	 7-хлор-ч -нитро-бензил 2-оксо-1,3-диазол		Ф (475/545 нм)

* УФ — спектрофотометр; Ф — флуориметр.

1	2	3	4
Меркаптаны R—SH	 7-хлор-4-нитро-бензил-2-оксо-1,3-диазол		Ф (420/525 нм)
Аминокислоты R—CH—COOH NH ₂	 пиридонсаль		Ф (330/400 нм)
Амины, имидазолы R—NH—R'	 4-Диметиламиноазобензол-4'-сульфохлорид (Дабсилхлорид)		УФ (425 нм)
Меркаптаны R—SH	То же		То же
Спирты, фенолы R—OH			»
Фенолы Ar-OH	 5-N,N'-диметил-аминонафталин-1-сульфохлорид (Дансилхлорид)		Ф (365/520 нм)
Амины, аминокислоты пептиды	 5-N,N'-диметил-аминонафталин-1-сульфохлорид (Дансилхлорид)		Ф (340/520 нм)
Альдегиды, кетоны RCOR'	 п-нитробензилоксиамин гидрохлорид		УФ (265 нм)
То же	 2,4-динитрофенилгидразин		УФ (254 нм)

Следовательно, выбор длины колонки и эффективности в каждом конкретном случае определяется той селективностью, которой обладает данная система по отношению к разделяемым соединениям, и требованиями к скорости разделения.

Повышение эффективности колонки — рациональный способ улучшения разделения только для достаточно сложных смесей, для простых и умеренно сложных смесей наиболее приемлема оптимизация селективности, позволяющая создавать более скоростные методики разделения.

В руководствах прежних лет отмечалось, что последовательное соединение колонок с целью увеличения суммарной эффективности положительного результата не дает. Вероятнее всего, такое мнение сформировалось из-за пользования недостаточно совершенными соединительными элементами. Наш опыт и данные, опубликованные в последние годы, свидетельствуют о том, что последовательное соединение колонок вполне осуществимо и эффективность при этом равна примерно сумме эффективностей отдельных колонок. Однако этим путем хроматографисты идут довольно редко, так как за удвоение эффективности приходится платить резким увеличением продолжительности разделения, работой насосов вблизи максимальных рабочих давлений.

Внутренний диаметр колонки. Как правило, в современной аналитической практике используются колонки с внутренним диаметром 2—6 мм. Этот параметр влияет в первую очередь на чувствительность детектирования при аналитической ВЭЖХ, а также определяет производительность колонок при препаративной хроматографии. При равной эффективности колонок, различающихся по внутреннему диаметру, объем пика увеличивается пропорционально площади поперечного сечения или квадрату диаметра. В результате одно и то же количество разделяемого вещества дает большую концентрацию вещества в пике при хроматографировании на колонках меньшего диаметра. Это обстоятельство становится решающим доводом в пользу миниатюризации ВЭЖХ в тех случаях, когда количество исследуемого вещества ограничено.

При увеличении диаметра, наоборот, отклик детектора на данное количество вещества становится меньше и одновременно возрастают максимально допустимые объем и масса пробы. Большинство фирм в качестве основного типоразмера выпускают колонки внутренним диаметром 4,6 мм, и, вероятно, на таких колонках выполняется сейчас не менее 90% аналитических разделений. В то же время несколько более дорогие колонки внутренним диаметром 6,2 мм, как нам кажется, наиболее целесообразны, когда необходимо масштабирование аналитического разделения до микропрепаративного уровня. Для этих колонок характерно сочетание умеренного расхода растворителей (1—2 л в смену) с производительностью (до 10 мг за один цикл разделения в благоприятных условиях).

Состав подвижной фазы. В ходе разработки методики разделения многокомпонентной смеси необходимо решить вопрос о целесообразности применения изократического либо градиентного элюирования. Анализ современной практики жидкостной хроматографии показывает, что градиентное элюирование довольно редко применяется при анализе лекарственных веществ, но становится необходимым при разделении сложных смесей биологического происхождения. Существенный недостаток такого способа элюирования в том, что возврат к исходному режиму по окончании разделения требует довольно значительного времени. Сравнивая возможности градиентного и изократического элюирования, продолжительность приведения колонки в исходное состояние следует суммировать с продолжительностью градиентного разделения. При таком подходе часто оказывается, что лучше провести длительное изократическое разделение, чем незначительно уступающее ему по продолжительности градиентное.

Выбор состава подвижной фазы для изократического разделения проводят на основании общих представлений и моделей, рассмотренных в главе 4.

Благодаря большой гибкости ВЭЖХ одна и та же проблема разделения может быть решена множеством способов, отличающихся характером используемых неподвижных фаз, и в особенности — составом подвижных фаз. Какие же из возможных составов следует признать наиболее подходящими? Разумеется, те, которые обеспечивают необходимое (но не избыточное!) разделение за минимальное время. При выборе соотношения сильного компонента подвижной фазы и разбавителя необходимо иметь в виду, что селективность разделения пары веществ часто несколько уменьшается с увеличением концентрации сильного компонента в подвижной фазе. Однако этот эффект не очень сильно выражен. Согласно (1.10), уменьшение коэффициентов емкости разделяемой пары соединений также приводит к ухудшению их разделения.

Следовательно, в общем случае разделение данной пары будет лучше, если пользоваться относительно слабым элюентом, однако при этом продолжительность разделения будет больше. В связи с этим целесообразно оценить оптимальные диапазоны значений k' для различных типов разделений.

На рис. 5.18 представлена зависимость критерия разделения R_s от коэффициентов емкости и относительных удерживаемых объемов. Видно, что кривые $R_s = f(k')$ стремятся к плато. В соответствии с (1.10) максимальное значение критерия R_s для данных N и α составляет

$$R_{s\max} = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \sqrt{N} \quad (5.2)$$

ГЛАВА 5

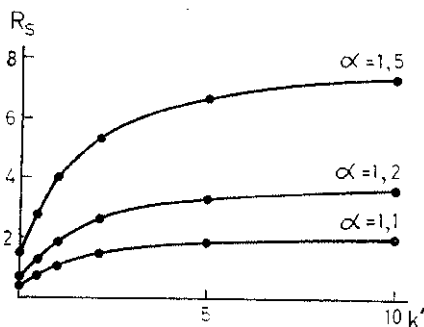


Рис. 5.18. Зависимость критерия разделения R_s от удерживания при различных значениях селективности α . Эффективность колонки 10000 теоретических тарелок.

Как следует из рис. 5.18, выигрыш в величине R_s довольно значителен при увеличении k' приблизительно до трех. Дальнейшее увеличение k' сопровождается очень медленным улучшением разделения. Следовательно, с точки зрения компромисса между достигаемым качеством разделения и его продолжительностью оптимальное значение k' равно примерно трем. Можно уверенно заявить, что если при таких величинах удерживания разделение неудовлетворительно, то следующим шагом по оптимизации должно быть либо радикальное увеличение эффективности колонки, либо изменение селективности за счет изменения состава подвижной фазы. Несколько иначе следует выбирать величину k' при разработке методик определения примесей. В этом случае избранный режим помимо отделения примесей от основного вещества должен обеспечивать обзор максимального диапазона полярности сорбатов. Поэтому желателен такой состав подвижной фазы, чтобы k' основного вещества был около 1,0. С другой стороны, в начальной части хроматограммы, вблизи t_0 , часто наблюдаются ложные пики различной природы; поэтому при выборе состава элюента необходимо строго соблюдать следующее правило: ни один интерпретируемый пик не должен иметь $k' < 0,2$.

Экспериментальный подбор условий разделения желательно начинать с испытания такой подвижной фазы, в которой ожидаемые значения коэффициентов емкости находятся в пределах 0,1—0,5. В этом режиме хроматографируют искусственную смесь, а также реальный образец. На основании хроматограммы искусственной смеси делают вывод, насколько в следующем эксперименте надо уменьшить силу подвижной фазы, чтобы при близиться к оптимальным значениям k' . Хроматограмма реального образца, снятая в первом режиме, позволяет выявить наличие сильно сорбирующихся примесей, которые могли бы быть «потеряны» при хроматографировании в более слабой подвижной фазе.

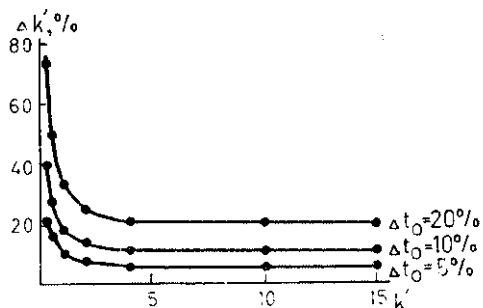


Рис. 5.19. Зависимость погрешности измерения коэффициентов емкости $\Delta k'$ от величины коэффициентов емкости и погрешности измерения t_0 .

При исследовании закономерностей хроматографического поведения условия эксперимента необходимо выбирать таким образом, чтобы погрешность измерения коэффициентов емкости была минимальной. Поскольку корректное определение величины t_0 , требуемой для расчета k' , встречает значительные затруднения, единственным реальным выходом, видимо, является выбор для этой цели *условно* несорбирующихся веществ. Разумеется, систематические погрешности измерения k' устранены не будут, но тем не менее такой подход создаст основу для рационального обобщения и интерпретации данных. Вообще, по нашему мнению, положение с измерением t_0 и k' излишне драматизировать не следует. Во-первых, погрешность измерения t_0 резко отрицательно сказывается только на слабоудерживаемых сорбатах. Согласно рис. 5.19, начиная с $k' \sim 4$ относительная погрешность k' равна погрешности измерения t_0 и практически постоянна для всех соединений с $k' > 4$. Во-вторых, при выводе закономерностей, подобных уравнениям (4.52) и (4.23), погрешность измерения k' станет составной частью свободного члена, а коэффициенты, описывающие влияние структуры сорбата или состава элюента, будут найдены правильно.

Таким образом, при исследовании закономерностей хроматографического поведения желательно выбирать такие составы подвижных фаз, чтобы коэффициенты емкости изучаемых соединений были не меньше 4.

В табл. 5.5 приведены условно несорбирующиеся вещества, неплохо зарекомендовавшие себя в лаборатории авторов.

Температура колонки. Температура, при которой проводится разделение, как правило, не оказывает решающего влияния на селективность, но определяет абсолютные величины удерживания. Повышение температуры разделения приводит к уменьшению времен удерживания, однако того же эффекта при необходимости проще можно добиться, несколько изменив состав подвижной фазы. В связи с этим большинство ВЭЖХ-разделений выполняется при комнатной температуре, и даже не все фирмы, специализирующиеся в жидкостной хроматографии, включают соответствующие термостаты колонок в свою производственную программу.

Таблица 5.5

Один из возможных наборов условно несорбирующихся веществ

Вариант хроматографии	Детектор	
	УФ-спектрофотометр	рефрактометр
Обращенно-фазовая	Нитрат натрия	Вода
Нормально-фазовая	Четыреххлористый углерод	Гексан

Термостатирование колонки при повышенных (до 40—60°C) температурах можно рекомендовать в тех случаях, когда используются подвижные фазы большой вязкости. Это позволяет значительно снизить давление в системе и расширить круг используемых растворителей. Например, при 60°C становится возможным использование изопропилового спирта в качестве органического компонента подвижной фазы в обращенно-фазовой хроматографии. Применение термостатирования необходимо также при прецизионных физико-химических измерениях.

Расход подвижной фазы выбирают в зависимости от внутреннего диаметра колонки, технических данных насоса, свойств разделяемых соединений. С точки зрения возможности воспроизведения методик правильнее было бы задавать не объемный расход через все сечение колонки, а расход через единицу сечения либо линейную скорость подвижной фазы. Тем не менее, поскольку насосы ВЭЖХ градуированы в единицах объемного расхода, именно этот параметр, как правило, приводится в описаниях методик.

Для низкомолекулярных сорбатов характерно незначительное уменьшение эффективности разделения с увеличением скорости подвижной фазы, что в принципе позволяет сильно сократить продолжительность анализа. Однако этой возможностью пользуются довольно редко, так как пропорционально расходу увеличивается давление на входе в колонку, что вызывает определенные неудобства. В результате используемые разными авторами величины расхода

подвижной фазы колеблются в сравнительно узких пределах. Так, почти все разделения на колонках с внутренним диаметром 4,6 мм выполняются при расходе подвижной фазы 1—2 мл/мин, что соответствует линейной скорости 1,5—4 мм/с (при характерных для ВЭЖХ значениях U_d). Именно эта величина представляет собой наиболее разумный компромисс между продолжительностью разделения и давлением. Разумеется, при масштабировании разделения на колонках иного диаметра расход следует изменить пропорционально площади поперечного сечения колонки.

Объем и концентрация пробы. Массу вещества, которую надлежит ввести в колонку, выбирают исходя из стоящих задач. Так, если необходимо препаративное выделение очищенных фракций либо определение примесей, стремятся ввести в колонку возможно большее количество пробы, в то время как при анализе реакционных смесей или лекарственных форм этого не требуется. Одно и то же количество исследуемого образца можно ввести в колонку в виде относительно большого объема менее концентрированного раствора либо в виде концентрированной пробы малого объема. При выборе объема и концентрации пробы руководствуются требуемой точностью дозирования, предельно допустимыми режимами разделения и детектирования.

Погрешность дозирования проб, как правило, снижается с увеличением их объема. Следовательно, когда этот показатель важен (например, при количественной обработке хроматограмм методом абсолютной калибровки), целесообразно выбирать объем, максимально допустимый для данных условий. Использование проб слишком большого объема может привести к заметному снижению эффективности разделения, особенно при работе с колонками эффективностью 10000—20000 теоретических тарелок. Чтобы реализовать всю эффективность, присущую данной колонке, объем пробы не должен превышать 1/10 части объема, соответствующего ширине хроматографического пика на половине его высоты. Предельный объем проб возрастает прямо пропорционально площади поперечного сечения слоя сорбента. Для колонок с внутренним диаметром 4,6 мм и эффективностью свыше 10000 теоретических тарелок он составляет примерно 25 мкл.

Если предстоит измерение и обработка основных пиков на хроматограмме, масса соответствующих компонентов, вводимых в колонку, не должна выходить за пределы линейности детектора. Максимальное с этой точки зрения количество вещества при детектировании по УФ-поглощению зависит в первую очередь от коэффициента экстинкции сорбата и его удерживания. В качестве ориентировочных пределов для соединений с молярным коэффициентом экстинкции порядка 10^4 можно назвать массу 10—50 мкг для колонок с внутренним диаметром 4,6 мм. Диапазон линейности малочувствительных детекторов, например рефрактометра, соответствует значительно большему количеству вещества. Поэтому при работе с ними (а также при препаративной хроматографии с УФ-детектором) приходится считаться уже не столько с перегрузкой детектора, сколько с перегрузкой слоя сорбента. Симметричная форма пиков, изначально присущая хорошей колонке, остается таковой лишь до тех пор, пока сорбция протекает в линейной части изотермы. При увеличении концентрации вещества в пробе свыше некоторого предела процесс на первых теоретических тарелках выходит из линейного режима, что приводит к нарастанию асимметрии, в особенности сильно проявляющемуся для сорбатов с большими k' . Предельная с этой точки зрения концентрация также сильно зависит от режима хроматографирования. Вероятность явлений подобного рода следует учитывать, если концентрация вещества в пробе превышает 2 мг/мл, хотя во многих случаях серьезные искажения хроматограммы не наступают и при 5—10 мг/мл.

Итак, выбор концентрации и объема анализируемой пробы — в каждом случае результат определенного компромисса. Такие компромиссные условия в современной ВЭЖХ найти, как правило, нетрудно. В качестве ориентировочных значений параметров, пригодных для первой попытки при разработке метода разделения на колонках диаметром 4,6 мм, укажем объем пробы 10—25 мкл, концентрацию 0,1—1 мг/мл для УФ-детекторов и 1—5 мг/мл для рефрактометра.

5.5.3. РЕГИСТРАЦИЯ И ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Несмотря на широкое развитие средств автоматизированной обработки хроматографических данных, не менее половины измерений по-прежнему выполняются вручную. В связи с этим уместно

остановиться на некоторых правилах записи хроматограмм на самопишущих потенциометрах и измерения хроматографических величин.

Время удерживания. Наибольшая точность измерения времени удерживания достигается при пользовании секундомером с ценой деления 0,2 с и менее. Однако этот прием не слишком удобен, так как «привязывает» оператора к хроматографу, к тому же точность фиксации момента максимума пика оператором невелика, и это обстоятельство частично сводит на нет усилия по максимально точному измерению времени удерживания с помощью секундомера. В связи с этим многие авторы измеряют время удерживания как расстояние на диаграммной ленте от момента ввода пробы до максимума пика. По нашему мнению, если точность лентопротяжного механизма проверена, такой прием вполне допустим. Необходимо только правильно выбрать скорость протяжки диаграммной ленты, чтобы измеряемые величины были не менее 20 мм.

Масштаб записи хроматограммы. Выбор масштаба записи хроматограммы определяется характером решаемой аналитической задачи. Общее правило при этом: масштаб следует выбирать таким, чтобы измеряемые пики на хроматограмме имели высоту 50—90% шкалы. Это требование обычно легко выполнить при анализе основных компонентов изучаемой смеси, однако оно может быть трудновыполнимым при анализе примесей, изучении биологических смесей на предельных чувствительностях детектирования. Ненадежно с метрологической точки зрения измерение пиков высотой 1—2% шкалы.

Скорость протяжки ленты самописца выбирается таким образом, чтобы обеспечить необходимую точность измерений времени удерживания и ширины пика. Один из критериев приведен выше: измеряемое расстояние, соответствующее времени удерживания, должно быть не менее 20 мм. С другой стороны, если предстоит измерение площадей пиков, развертка должна быть такой, чтобы ширина пиков на половине высоты была не менее 5 мм.

Площадь или высота пика. Обе эти величины используются при количественной обработке хроматограмм, выбор той или иной из них диктуется отчасти методом количественного расчета. Так, при использовании метода нормализации допустимо только измерение площадей, в то время как методы внутреннего стандарта и абсолютной калибровки допускают пользование и высотами, и площадями пиков. С физической точки зрения, конечно, более обоснованно измерение площади пиков. Однако при использовании современного оборудования и методических приемов во многих случаях ширина данного пика есть постоянная величина, и, значит, площадь пика определяется лишь его высотой. В то же время измеренная вручную ширина пика, по-видимому, служит основным источником суммарной погрешности анализа. Поэтому во всех случаях, где это возможно, после соответствующей проверки необходимо рекомендовать ручное измерение высоты пика вместо его площади как более простое и не менее точное.

Приемы измерения пиков в ВЭЖХ практически идентичны тем, которыми пользуются в газовой хроматографии. Они многократно описаны в литературе, поэтому здесь сошлемся лишь на специальное руководство, посвященное количественным аспектам хроматографического анализа [14].

5.6. ОПИСАНИЕ МЕТОДИК АНАЛИЗА

Форма и содержание описания методики, а также результатов могут различаться в зависимости от цели выполняемой работы, характера итогового документа, контингента специалистов, для которых предназначается данная методика или результаты. В самом общем случае, при наиболее подробном изложении описание должно включать следующую информацию:

- характеристику аналитической задачи и изучаемого объекта;
- обзор литературных сведений о решении данной или аналогичной задачи;
- обоснование выбора ВЭЖХ как метода решения данной задачи;
- описание использованной аппаратуры, материалов и реактивов;
- экспериментальное или теоретическое обоснование выбора условий разделения;
- обоснование использованного метода подготовки пробы к анализу;
- обоснование метода качественного анализа;
- обоснование условий детектирования, регистрации хроматограммы, обработки данных и метода количественной интерпретации результатов;
- статистическую оценку предлагаемого метода;

— собственно методику, т. е. последовательное изложение области применимости, условий разделения, операций по подготовке пробы, выполнению анализа, вычислению результатов;
— результаты анализа.

Представленная здесь структура описания напоминает традиционную структуру научных статей по аналитической химии. Перечисленные разделы в своей совокупности должны давать полное представление о теоретической и экспериментальной обоснованности методики, ее возможностях; методическая часть должна быть максимально компактной и одновременно содержать всю информацию, необходимую для воспроизведения анализа. В качестве примера приводим схему методики, используемую в лаборатории авторов:

- 1) наименование;
- 2) характеристика объекта анализа. Указывается, для какого объекта (реакционная смесь, технический продукт, лекарственная форма и т. п.) и каких предельных концентраций определяемого вещества данная методика разработана;
- 3) хроматограф. Указываются все марки хроматографов, на которых данная методика выполнялась;
- 4) детектор;
- 5) колонка. Указываются геометрические размеры; сорбент; минимальная эффективность, обеспечивающая решение поставленной задачи;
- 6) подвижная фаза. Указываются качественный и количественный состав; объемный расход; условно несорбирующееся вещество и его время удерживания; линейная скорость подвижной фазы;
- 7) температура колонки;
- 8) подготовка пробы. Дается детальное описание приготовления всех анализируемых и калибровочных растворов;
- 9) объем пробы;
- 10) требования к условиям регистрации хроматограмм. Указываются скорость диаграммной ленты и масштаб записи;
- 11) качественный анализ. Указываются коэффициенты емкости или относительные удерживаемые объемы компонентов;
- 12) методика расчета. Приводится формула расчета определяемых величин.

5.7. ПРЕПАРАТИВНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В аналитической лаборатории препаративная хроматография чаще всего применяется для выделения образцов индивидуальных соединений с целью дальнейшего их исследования, установления структуры другими физико-химическими методами. Необходимое для этих целей количество вещества редко превышает 100 мг, а работы такого рода являются не систематическими, а эпизодическими. Поэтому препаративная хроматография подобных масштабов основана на тех же принципах, что и хроматография аналитическая.

При дальнейшем укрупнении масштабов разделения, переходе от препаративной хроматографии к производственной все большую роль начинают играть факторы, которые в аналитической практике не столь существенны: требования экономики, техники безопасности, охраны труда и окружающей среды. В этой ситуации традиционные решения, основанные на использовании проявительной ВЭЖХ, часто не выдерживают критики с точки зрения инженерно-технологической, потому разработка крупномасштабных хроматографических процессов является самостоятельной задачей. Рассмотрение ее выходит за рамки данной книги, здесь мы остановимся только на вопросах масштабирования ВЭЖХ от обычной аналитической до препаративной хроматографии производительностью 10—1000 мг в одном цикле разделения.

Пути увеличения производительности хроматографического процесса рассмотрим на примере гипотетического разделения бинарной смеси X_1 , X_2 . Ее хроматограмма на аналитической колонке приведена на рис. 5.20,а, условия разделения — в табл. 5.6. Простейший прием масштабирования — воспроизведение аналитической методики на колонке большего диаметра, заполненной идентичным сорбентом. Этот прямолинейный подход не требует никаких дополнительных экспериментов. В настоящее время рядом фирм выпускаются препаративные ВЭЖХ-колонки с

внутренним диаметром свыше 20 мм. Следовательно, воспроизведя процесс на такой колонке, можно увеличить массу разделяемой смеси примерно в 20 раз (рис. 5.20,б) и получить за один цикл по 0,4 мг очищенных веществ. Однако, если учесть объем растворителей и время, затраченное на разделение, станет ясно, что такой результат совершенно неудовлетворителен. Дальнейшего повышения производительности можно достичь следующим образом:

- увеличить концентрацию разделяемой смеси;
- увеличить объем вводимой пробы;
- применить подвижную фазу большей растворяющей способности;
- применить подвижную фазу большей селективности.

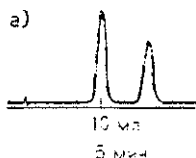
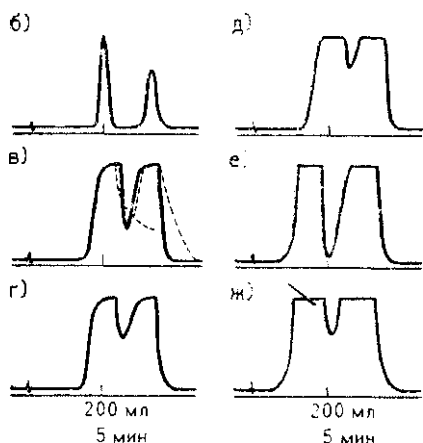


Рис. 5.20. Масштабирование разделения. Условия см. в табл. 5.6.



Увеличение концентрации разделяемой смеси при сохранении прежних условий хроматографирования приводит к нарушению линейности сигнала детектора и перегрузке сорбента. В данном случае линейность сигнала большого значения не имеет. Разумеется, при интерпретации препаративных хроматограмм этот эффект следует иметь в виду. На рис. 5.20,в представлена хроматограмма, детектирование которой осуществлялось за пределами линейной области. Минимальная высота впадины между пиками составляет около половины высоты пиков. Однако истинное качество разделения выше, чем, это показывает хроматограмма в таком нелинейном режиме детектирования. Картина, подобная приведенной, не должна обескураживать оператора: получение чистых фракций даже в этом случае вполне вероятно. В приведенном примере пики хотя и имеют плоские вершины, но еще симметричны; следовательно, перегрузка касается пока только работы детектора. При дальнейшем увеличении концентрации образца возможна перегрузка сорбента, что приведет к образованию «хвостов» и снижению чистоты фракций (пунктирная линия на рис. 5.20,о). Перегрузку сорбента иногда удается уменьшить, взяв подвижную фазу лучшей растворяющей способности (рис. 5.20, г).

Условия экспериментов по масштабированию ВЭЖХ-разделения

Хроматограмма на рис. 5.20	Размер колонки, мм	Подвижная фаза	Селективность	Объем пробы, мкл	Концентрация, мг/мл	Масса пробы, мг	Производительность, мг	
							за 1 мин	на 1 мл подвижной фазы
а	4,6x250	АБ ₁	1,5	10	2	0,02	0,002	0,001
б	21,2x250	АБ ₁	1,5	2·10 ²	2	0,4	0,04	0,001
в	21,2x250	АБ ₁	1,5	2·10 ²	40	8	0,8	0,02
г	21,2x250	АБ ₂	1,5	2·10 ²	100	20	2	0,05
д	21,2x250	АБ ₂	1,5	2·10 ³	100	200	20	0,5
е	21,2x250	АБ ₃	2,0	2·10 ³	100	200	20	0,5
ж	21,2x250	АБ ₃	2,0	2·10 ⁴	100	2000	200	5,0

Далее, поскольку объем пиков на хроматограмме рис. 5.20,г и так уже велик, разделение ухудшится лишь незначительно, если увеличить объем вводимой пробы, например, до 2000 мкл (рис. 5.20,д).

Наконец, наиболее мощное средство повышения производительности — оптимизация селективности системы. Представим, что при сохранении прежней элюирующей силы удалось подобрать подвижную фазу с большей селективностью по отношению к разделяемой паре веществ. На хроматограмме (рис. 5.20,е) между зонами X_1 и X_2 появилось свободное пространство, которое позволяет еще в 10 раз увеличить объем разделяемой смеси при сохранении удовлетворительного разделения и чистоты фракций. Производительность процесса достигает вполне удовлетворительной величины как по отношению к затраченному времени, так и по отношению к количеству израсходованного растворителя (рис. 5.20,ж).

5.8. НЕПОЛАДКИ В ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

Современный жидкостный хроматограф представляет собой сложный агрегат с химическими, электромеханическими и электронными подсистемами. Ни одна из этих подсистем не обладает бесконечной надежностью, поэтому каждый хроматографист периодически сталкивается с отказами и неполадками в работе отдельных узлов. В то же время опыт показывает, что лишь незначительная часть проблем бывает вызвана действительной неисправностью того или иного узла прибора. Чаще всего неполадки связаны с естественными процессами, происходящими при длительной работе прибора или колонки, а также с нарушениями допустимых режимов работы со стороны оператора. Поэтому, столкнувшись с какими-либо ненормальными явлениями при работе прибора, полезно руководствоваться следующими правилами:

— не впадать в панику, последовательно проверить правильность положения всех органов управления прибором;

— восстановить последовательность событий — какие действия оператора предшествовали появлению неполадки?

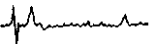
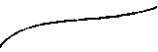
— воспроизвести какой-либо хорошо знакомый режим анализа или то разделение, на котором пускал в эксплуатацию прибор представитель завода-изготовителя;

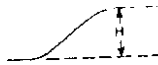
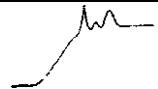
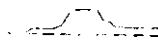
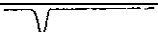
— проанализировать логически связь узлов прибора и выявить узлы, которые не могут быть причиной наблюдаемых явлений;

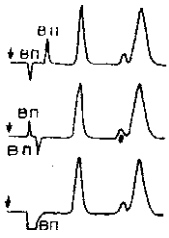
— последовательно переключая органы управления и соединения остальных узлов, наблюдать отклик прибора и логическим анализом установить, какой из узлов стал причиной неполадок;

— уяснить характер неполадки: химический (загрязнение любых элементов) или выход из строя каких-либо механических либо электронных деталей. Лишь в последних двух случаях обратиться за помощью к наладчику.

Наиболее характерные неполадки, способы их диагностики и устранения приведены в табл. 5.7.

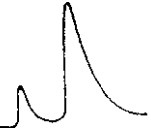
1	2	3	4	5
			<p>4.4. Загрязнена ячейка детектора</p> <p>4.5. Неисправна лампа</p>	<p>Промыть ячейку спиртом, водой, 30%-ной азотной кислотой, водой, спиртом. Внимательно рассмотреть окошки ячейки, в случае необходимости заменить их</p> <p>Заменить лампу</p>
<p>5. Непериодические всплески на базовой линии</p>		<p>Отсоединить колонку от детектора, детектор промыть подвижной фазой со скоростью 5 — 20 мл/мин. Если при повторном подключении колонки всплески возобновятся, то вероятен дефект фильтра на выходе из колонки либо расслоение несмешивающихся компонентов подвижной фазы</p>	<p>5.1. Взвешенные твердые частицы или капли растворителя в ячейке</p>	<p>Проверить совместимость компонентов подвижной фазы, целостность фильтра на выходе колонки</p>
<p>6. Дрейф базовой линии при изократическом режиме работы, без ввода проб</p>		<p>Остановить насос на 10 — 15 мин; — характер дрейфа не меняется; — дрейф прекращается</p>	<p>6.1. Неисправность лампы, электронной схемы или подключения детектора</p> <p>6.2. Колонка не уравновешена подвижной фазой</p> <p>6.3. Элюируются прочно сорбированные компоненты ранее введенных проб</p>	<p>Проверить контакты, электронику, при необходимости заменить лампу</p> <p>Промыть колонку не менее чем 50 объемами подвижной фазы</p> <p>Промыть колонку не менее чем 50 объемами более сильного элюента</p>

7. То же, при периодическом вводе проб		Периодичность дрейфа совпадает с периодичностью ввода проб	7.1. Элюируются прочно сорбированные компоненты из вводимых проб	Использовать подвижную фазу большей силы или градиентное элюирование. При невозможности — увеличить интервал времени между последовательными вводами проб
8. Дрейф базовой линии при использовании рефрактометрическим детектором		Часто встречается, особенно после изменения состава подвижной фазы	8.1. Колебания температуры ячейки 8.2. Колебания состава подвижной фазы	Термостатировать ячейку Желательно промыть колонку и обе ячейки детектора подвижной фазой
9. Дрейф базовой линии при градиентном элюировании		— строго соответствует по периодичности градиенту и имеет постоянную амплитуду H — при последовательных циклах градиента амплитуда изменяется	9.1. Оптическая плотность компонентов градиента А и В различна 9.2. Элюирование загрязнений, скопившихся в колонке	При возможности использовать растворители близкой оптической плотности Длительно промывать колонку растворителем В
10. Ложные пики при градиентном элюировании		Наблюдаются также при выполнении градиента без ввода пробы	10.1. Элюирование примесей в растворителе А, накопившихся на начале колонки	Использовать очищенный растворитель А
11. Ступенчатый характер записи хроматограммы, плоские вершины невысоких пиков, базовая линия не возвращается на исходный уровень			11.1. Неправильная регулировка чувствительности и демпфирования самописца	Отрегулировать самописец
12. Отрицательные пики		— все пики на хроматограмме	12.1. Неправильная полярность подключения детектора к самописцу	Переключить полярность


		— часть пиков на хроматограмме с УФ-детектором	12.2. Проба содержит компоненты, слабее поглощающие УФ-свет, тем подвижная фаза	Использовать для растворения пробы подвижную фазу. Использовать более чистую подвижную фазу
13. Вакансионные пики (ВП)		Времена удерживания соответствуют временам удерживания компонентов подвижной фазы, не зависят от типа сорбатов	13.1. Локальные изменения состава подвижной фазы в результате процессов сорбции — десорбции	При возможности использовать УФ-детектор, на котором этот эффект выражен слабее. При использовании рефрактометрическим детектором стараться составлять элюенты из растворителей с близкими коэффициентами преломления
14. При работающем насосе отсутствует поток на выходе и л детектора		Проверить правильность сборки системы Проверить давление: — выше нормы — нормальное — ниже нормы или отсутствует	14.1. Система неправильно собрана 14.2. Засорен дозатор или один из фильтров 14.3. Дозатор находится в неправильном (промежуточном) положении 14.4. Утечка в уплотнениях после колонки или в детекторе 14.5. Наличие воздуха или загрязнений в клапанах насоса 14.6. Нарушение уплотнений насоса	Устранить ошибку Последовательным отсоединением элементов выявить засоренный, заменить его или промыть Правильно переключить дозатор Устранить утечку, подтянув уплотнения или заменив дефектные детали Дегазировать подвижную фазу, промыть насос Заменить изношенные детали
15. Давление в приборе значительно выше обычного		Расход элюента на выходе из детектора нормальный	15.1. Засорение одного из фильтров	Последовательно отсоединяя детектор от колонки, колонку от дозатора, наблюдать за изменениями давления. Заметное падение давления должно быть только на колонке. Выявить засоренный элемент, заменить его или прочистить

<p>16. Продолжительное время после запуска насоса нет стабилизации давления в системе</p>		<p>Остановить насос, открыть дренажный кран, измерить скорость самопроизвольного вытекания подвижной фазы. Отсоединить фильтр в резервуаре с подвижной фазой и снова измерить скорость</p>	<p>16.1. Большая разница измеренных скоростей потока указывает на засорение фильтра подвижной фазы 16.2. Незначительная разница скоростей указывает на засорение или неисправность клапанов или уплотнений насоса</p>	<p>Прочистить или заменить фильтр См. п. 2.2</p>
<p>17. Давление в приборе ниже обычного</p>		<p>Расход элюента на выходе из колонки меньше обычного Расход элюента на выходе из насоса нормальный при отсутствии колонки, после подключения колонки на ее выходе расход ниже нормы</p>	<p>17.1. Засорение или неисправность клапанов, утечка 17.2. Утечка из насоса, неисправность или /засорение клапанов</p>	<p>Проверить все соединения, промыть клапаны, подтянуть или заменить фитинги Заменить пришедшие в негодность уплотнения, промыть клапаны 30%-ной азотной кислотой</p>

<p>18. Не удается установить базовую линию на заведомо исправном самописце</p>		<p>Перо самописца реагирует при кратковременной блокировке потока подвижной фазы из детектора</p> <p>Наблюдается на любых подвижных фазах</p> <p>Наблюдается на некоторых подвижных фазах</p> <p>На короткое время соединить последовательно измерительную и сравнительную ячейки детектора. Самописец устанавливается на нуль</p>	<p>18.1. Пузырек воздуха в одной из ячеек детектора</p> <p>18.2. Загрязнена ячейка детектора</p> <p>18.3. Неисправна лампа</p> <p>18.4. Неисправна электроника детектора</p> <p>18.5. Чувствительность самописца не соответствует сигналу детектора</p> <p>18.6. Применяемый растворитель не соответствует избранной длине волны УФ-детектора</p> <p>18.7. Непрозрачные для УФ-света примеси в подвижной фазе</p> <p>18.8. Неидентичность состава растворителей в измерительной и сравнительной ячейках детектора</p>	<p>Отсоединив колонку, промыть ячейку детектора подвижной фазой при расходе 5 — 20 мл/мин. Тщательно дегазировать элюент</p> <p>Промыть ячейку</p> <p>Заменить лампу</p> <p>Обратиться к специалисту-электронщику</p> <p>Заменить самописец подходящим</p> <p>Заменить подвижную фазу или изменить длину волны</p> <p>Использовать растворители специальной очистки</p> <p>Промыть сравнительную ячейку подвижной фазой</p>
--	--	---	--	--

<p>19. Пики асимметричны</p>		<p>Снять хроматограмму хорошо изученной смеси в заведомо подходящих условиях. Если пики симметричны, колонка исправна Форма пиков и эффективность лучше для позже выходящих пиков Форма пиков улучшается при уменьшении расхода подвижной фазы Форма пиков улучшается при уменьшении концентрации пробы Асимметрия увеличивается или остается постоянной при уменьшении концентрации или объема пробы</p>	<p>19.1. Если пики на контрольной хроматограмме несимметричны, колонка вышла из строя 19.2. Свободные объемы в системе недопустимо велики для колонки данного размера 19.3. Недостаточная скорость массопередачи 19.4. Перегрузка колонки 19.5. Недостаточная растворимость компонента 19.6. Неоднородность активных центров сорбента. Сорбция по нескольким механизмам</p>	<p>Заменить колонку Устранить избыточные свободные объемы либо использовать колонку большего объема. Использовать другой сорбент, либо повысить температуру колонки, либо работать при малой скорости подвижной фазы Разбавить образец подвижной фазой Использовать подвижную фазу с лучшей растворяющей способностью — заменить сорбент более подходящим или — изменить состав подвижной фазы. При хроматографии на силикагеле ввести в подвижную фазу до 1 % уксусной кислоты (если сорбаты — кислоты) или амина (если сорбаты — основания). При обращенно-фазовой хроматографии подобрать подходящий состав буферного раствора. Хороший эффект дает переход к ион-парному режиму</p>
------------------------------	---	---	--	---

<p>20. Искаженная форма пиков заведомо индивидуальных веществ</p>		<p>Характерна для /всех пиков хроматограммы, не зависит от природы сорбатов</p> <p>Наблюдается в ион-парной хроматографии</p> <p>Эффект становится менее выраженным с увеличением расхода подвижной фазы</p> <p>Эффект не зависит от расхода подвижной фазы, повторная хроматография выделенных фракции снова дает сдвоенные пики</p>	<p>20.1. Полость в верхней части колонки</p> <p>20.2. Несоответствие концентрации ион-парного агента и концентрации сорбата</p> <p>20.3. Химическое превращение в колонке</p> <p>20.4. В колонке разделяются взаимодействующие изомеры, таутомеры и т. п.</p>	<p>Разобрав фитинг на входе колонки, шпателем выровнять поверхность сорбента, плотно заполнить полость свежей порцией сорбента, смоченного подвижной фазой.</p> <p>Уменьшить концентрацию пробы и (или) увеличить концентрацию ион-парного агента</p> <p>Использовать менее реакционноспособный сорбент и подвижную фазу</p> <p>Попытаться изменить pH, состав подвижной фазы</p>
<p>21. Два пика при хроматографии заведомо индивидуального вещества</p>		<p>Соотношение площадей пиков изменяется с течением времени, при повторных вводах пробы</p>	<p>21.1 Химическая реакция в растворе образца</p>	<p>Попытаться устранить условия, способствующие реакции</p>
<p>22. При постоянных расходе и составе подвижной фазы давление в системе постепенно увеличивается</p>		<p>Ввод проб — усугубляет эффект</p> <p>— не влияет на эффект</p>	<p>22.1. Механические примеси в пробах</p> <p>22.2. Механические примеси в подвижной фазе</p>	<p>Тщательно отфильтровать пробы</p> <p>Тщательно отфильтровать подвижную фазу, установить проточный фильтр</p>

23. Возрастание давления в системе при градиентном элюировании		Нормальное явление, если прирост давления отвечает изменению вязкости подвижной фазы	23.1. Если прирост давления не соответствует увеличению вязкости, можно предполагать выпадение осадков солей при смешении растворителей	Проверить совместимость растворителей, при необходимости изменить их состав
24. Пики широки, симметричны и имеют плоские вершины		При уменьшении концентрации или объема пробы — картина нормализуется — высота пика уменьшается, но ширина остается прежней	24.1. Перегрузка детектора 24.2. Частичное разделение двух веществ	Работать с меньшими по объему или более разбавленными пробами. Увеличить эффективность колонки или селективность системы
25. Существенное уменьшение эффективности		Снять хроматограмму хорошо изученных соединений — эффективность нормальная — эффективность низкая	25.1. Не подходящая для данного объекта подвижная фаза или сорбент 25.2. Загрязнение сорбента 25.3. Полость в верхней части слоя сорбента	Продолжить поиск подходящих условия разделения Промыть колонку согласно рекомендациям 5.3 См. п. 20.1
26. Нерегулярные колебания коэффициентов емкости при формировании состава подвижной фазы с помощью двух насосов		Явление особенно выражено при малых k' , а также в тех случаях, когда скорость подачи растворителя Б очень мала	26.1. Колебания объемной подачи растворителя Б	При возможности подавать одним насосом заранее приготовленную смесь растворителей. При градиентном элюировании рекомендуется подавать насосом Б не чистый растворитель Б, а его подходящую смесь с А