



М И Р Х И М И И

Ллойд Р. Снайдер
Джон У. Долан

**Высокопроизводительная
градиентная элюция:
практическое применение модели
линейного изменения элюирующей
силы растворителя**

Перевод с английского
к.б.н. С.Б. Гомбоевой и О.А. Петуховой
под общей редакцией
к.т.н. М.Б. Бару

ТЕХНОСФЕРА
Москва
2015

УДК 543.544.5

ББК 24.46

C53

C53 Снайдер Ллойд Р., Долан Джон У.

Высокопроизводительная градиентная элюция: практическое применение модели линейного изменения элюирующей силы растворителя

Москва: ТЕХНОСФЕРА, 2015. – 584 с. + 2 с. цв. вкл., ISBN 978-5-94836-404-9

В книге детально рассмотрены проблемы разделения в жидкостной колоночной хроматографии высоких давлений и основы градиентной элюции: эффект градиентной элюции при разделении, оптимизация градиентного разделения, компьютерное моделирование градиентной элюции, сходимость результатов моделирования, оборудование для градиентной хроматографии, выбор хроматографической системы и ее тестирование, вопросы воспроизводимости полученных результатов, артефакты воспроизведения, неисправности и способы их устранения, разделение больших молекул, препаративные разделения, различные применения градиентной элюции в LC-MS, в ионообменной и нормально-фазной хроматографии, модель линейного изменения элюирующей силы растворителя.

Книга будет интересна практикующим хроматографистам.

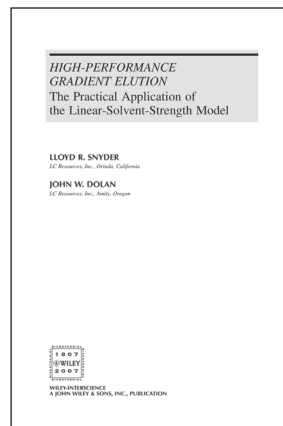
УДК 543.544.5

ББК 24.46

© 2007 by John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Все права защищены. Авторизованный перевод с английского издания «Джон Вайли энд Санс Лимитид». ЗАО РИЦ «ТЕХНОСФЕРА» несет полную ответственность за правильность перевода. «Джон Вайли энд Санс Лимитид» освобождается от этой ответственности. Ни одна часть книги не может быть воспроизведена в какой-либо форме без письменного разрешения правообладателя оригинала «Джон Вайли энд Санс Лимитид».

© 2015, ЗАО «РИЦ «ТЕХНОСФЕРА», перевод на русский язык, оригинал-макет, оформление



ISBN 978-5-94836-404-9

ISBN 978-0-471-70646-5 (англ.)



Двухвековой юбилей издательства «Уайли»: знания — поколениям

У каждого поколения свои запросы и свои устремления. Чарльз Уайли впервые открыл свою крошечную типографию в Нижнем Манхэттене в 1807 году во времена поколения, без усталости искавшего себя. И наше издательство было вместе с этим поколением, помогая формировать новую американскую литературную традицию. Более полувека спустя, в разгаре Второй промышленной Революции, новое поколение сконцентрировалось на построении будущего. И опять мы были вместе с поколением, обеспечивая его крайне необходимыми научными, техническими и инженерными знаниями, которые помогли построить новый мир. На протяжении двадцатого столетия и в начале нового тысячелетия нации вышли за пределы собственных границ и родилось новое интернациональное сообщество. Не отстало и «Уайли», распространив свою деятельность на весь мир, с тем чтобы обеспечить глобальный обмен идеями, мнениями и ноу-хау.

На протяжении двух веков издательство «Уайли» является неотъемлемой частью поисков каждого поколения и служит проводником информации и понимания, столь необходимых для удовлетворения потребностей и осуществления устремлений. Сегодня дерзкие новые технологии изменяют подход к жизни и ее изучению. «Уайли» не останется в стороне от этого процесса, обеспечивая вас необходимыми знаниями, без которых не представить ни новых миров, ни возможностей, ни перспектив.

Поколения приходят и уходят, но вы всегда можете положиться на издательство «Уайли», которое снабдит вас той информацией, которая вам нужна, тогда, когда она вам нужна, и там, где она вам нужна.

Уильям Дж. Пичи
Президент и главный исполнительный директор

Петер Бут Уайли
Председатель правления

*... всякая естественная наука заключает в себе три вещи:
ряд явлений, на которых она основана
(экспериментальные исследования),
абстрактные концепции, которые соединяют эти явления
между собой в нашем сознании (модель),
и слова, в которые эти концепции облечены
(книга, которую вы держите перед собой).*

Антуан Лоран Лавуазье
(с заметками автора на полях),
«Элементарный курс химии» (1789)

Содержание

Предисловие редактора перевода	11
Предисловие	13
Литература.	18
Словарь условных обозначений и принятых сокращений	19
Глава 1. Введение	26
1.1. «Основная проблема элюирования» и необходимость градиентного элюирования	26
1.2. Другие причины, побуждающие использовать градиентную элюцию	30
1.3. Профиль градиента	32
1.4. Общие черты градиентного и изократического процессов	35
1.4.1. Сравнение изократического и градиентного элюирования	36
1.4.2. Модель линейного изменения элюирующей силы растворителя (ЛИС).	39
1.5. Компьютерное моделирование	45
1.6. Классификация образцов	46
1.6.1. Образцы соединений с родственной структурой («правильные образцы»)	46
1.6.2. Образцы соединений с неродственной структурой («неправильные образцы»).	46
Литература.	49
Глава 2. Принципы градиентной элюции	51
2.1. Изократическое разделение	51
2.1.1. Удерживание	51
2.1.2. Ширина пиков и число теоретических тарелок	52
2.1.3. Разрешение	53
2.1.4. Значение условий разделения	55
2.2. Градиентное разделение	61
2.2.1. Удерживание	62
2.2.2. Ширина пиков	68
2.2.3. Разрешение	69
2.2.4. Степень сложности образца и емкость по пикам	78
2.3. Влияние градиентных условий на разделение	81
2.3.1. Скорость нарастания градиента b : изменение времени градиента	82
2.3.2. Скорость нарастания градиента b : изменения длины или внутреннего диаметра колонки	84
2.3.3. Скорость нарастания градиента b : изменение скорости потока	88
2.3.4. Пределы градиента $\Delta\phi$: изменение начального значения процента $V(\phi_0)$	91
2.3.5. Область градиента $\Delta\phi$: изменение конечного значения процента $V(\phi_r)$	96
2.3.6. Влияние задержки градиента	97
2.3.7. Влияние профиля градиента (нелинейные градиенты)	101

2.3.8. Заключительный обзор влияния градиентных условий на хроматографическое разделение	106
2.4. Смежные вопросы	107
2.4.1. Неидеальное удерживание в градиентном элюировании	107
2.4.2. Заблуждения, связанные с градиентным элюированием	107
Литература	108
Глава 3. Разработка методики разделения	110
3.1. Последовательный подход к разработке методики разделения	110
3.1.1. Цели разделения (первый этап, рис. 3.1)	112
3.1.2. Природа образца (второй этап, рис. 3.1).	115
3.1.3. Начальные экспериментальные условия	116
3.1.4. Воспроизводимость результатов	116
3.1.5. Компьютерное моделирование: да или нет?	117
3.1.6. Предварительная обработка образца (пробоподготовка)	118
3.2. Предварительные эксперименты	119
3.2.1. Анализ первичной хроматограммы (третий этап, рис. 3.1).	122
3.3. Разработка градиентного метода: зависимость разрешения от условий эксперимента	128
3.3.1. Оптимизация градиентного коэффициента удерживания k^* (четвертый этап, рис. 3.1).	130
3.3.2. Оптимизация коэффициента селективности α^* в градиентном режиме (пятый этап, рис. 3.1)	131
3.3.3. Оптимизация градиента (шестой этап, рис. 3.1)	135
3.3.4. Кусочно-линейные градиенты (продолжение шестого этапа, рис. 3.1).	140
3.3.5. Оптимизация числа теоретических тарелок N^* (седьмой этап, рис. 3.1).	143
3.3.6. Уравновешивание колонки между последовательными разделениями.	147
3.3.7. Экспресс-разделения	148
3.4. Компьютерное моделирование	149
3.4.1. Количественные прогнозы и карты разрешения	151
3.4.2. Оптимизация градиента	154
3.4.3. Изменение параметров колонки	156
3.4.4. Разделение «правильных» образцов	157
3.4.5. Другие возможности компьютерного моделирования	159
3.4.6. Точность компьютерного моделирования	162
3.4.7. Отслеживание пика	163
3.5. Воспроизводимость метода	163
3.5.1. Разработка метода	165
3.5.2. Рутинные анализы	166
3.5.3. Изменение объема колонки	168
3.6. Дополнительные способы повышения селективности	169
3.7. Ортогональные разделения	172
3.7.1. Двумерные разделения	175
Литература	176

Глава 4. Оборудование для градиентной хроматографии	180
4.1. Конфигурации градиентных систем.	180
4.1.1. Смешивание на линии высокого давления в сравнении со смешиванием на линии низкого давления	181
4.1.2. Выбор оптимального варианта	182
4.2. Основные рекомендации по выбору хроматографических систем.	193
4.2.1. Как выбрать поставщика?	194
4.2.2. Перемешивание на стороне высокого или низкого давления?	195
4.2.3. Кому осуществлять наладку?	195
4.2.4. Прикладные задачи	195
4.3. Определение эффективности градиентной системы.	196
4.3.1. Проверка формирования градиента	197
4.3.2. Дополнительное тестирование хроматографов.	201
4.4. Оценка объема задержки	204
Литература	205
Глава 5. Шумы при разделении и неисправности	206
5.1. Предотвращение проблем	207
5.1.1. Проверка оборудования	211
5.1.2. Объем задержки.	212
5.1.3. Холостой градиент	212
5.1.4. Практические рекомендации для выполнения повседневной работы.	213
5.1.5. Разработка метода	215
5.2. Перенос метода	219
5.2.1. Компенсация различия объемов задержки	219
5.2.2. Другие источники возникновения проблем при переносе метода	225
5.3. Уравновешивание колонки	228
5.3.1. Первичные эффекты	229
5.3.2. Медленное уравновешивание колонки и подвижная фаза	231
5.3.3. Практическая оценка и рекомендации	232
5.4. Артефакты разделения	234
5.4.1. Дрейф базовой линии	235
5.4.2. Шумы базовой линии	239
5.4.3. Пики холостого градиента	242
5.4.4. Дополнительные пики в анализируемых образцах.	245
5.4.5. Искажения профиля пика	248
5.5. Диагностика неисправностей	257
5.5.1. Выявление проблемы	258
5.5.2. Устранение неполадок и рекомендации по техническому обслуживанию	260
5.5.3. Тестирование работы градиентной системы	271
5.5.4. Примеры диагностики неполадок.	280
Литература	295
Глава 6. Разделение крупных молекул.	297
6.1. Общие соображения	297
6.1.1. Значения S крупных молекул.	298

6.1.2. Величины N^* для макромолекул	304
6.1.3. Конформационное состояние.	306
6.1.4. Гомо-олигомерные образцы.	309
6.1.5. Предполагаемые модели процесса градиентного разделения крупных молекул	313
6.2. Биополимеры	321
6.2.1. Пептиды и белки	321
6.2.2. Другие виды разделений и образцов.	335
6.2.3. Проблемы разделения	347
6.2.4. Экспресс-анализ пептидов и белков.	350
6.2.5. Двумерные разделения пептидов и белков	351
6.3. Синтетические полимеры	351
6.3.1. Определение распределения молекулярной массы	353
6.3.2. Определение химического состава	355
Литература	356
Глава 7. Препаративные разделения	361
7.1. Введение	361
7.1.1. Оборудование, используемое в препаративной хроматографии	364
7.2. Изократическое разделение	364
7.2.1. Разделение соприкасающихся пиков	365
7.2.2. Разработка методики разделения методом соприкасающихся пиков для изократического режима	371
7.2.3. Способ разделения за пределами соприкасающихся пиков	381
7.3. Градиентные разделения.	383
7.3.1. Разделение соприкасающихся пиков	387
7.3.2. Разработка методики градиентного разделения соприкасающихся пиков	387
7.3.3. Перегрузка по объему пробы	394
7.3.4. Возможные сложности в теории соприкасающихся пиков и их практическое решение	394
7.4. Сильно перегруженное разделение	398
7.4.1. Так ли уж необходим градиент?	398
7.4.2. Эффект смещения	400
7.4.3. Разработка методики	401
7.4.4. Разделения пептидов и небольших белков	402
7.4.5. Эффективность колонки	403
7.4.6. Разделение в промышленных масштабах	404
Литература	405
Глава 8. Применение градиентного элюирования в других областях хроматографии	406
8.1. Градиентное элюирование в ЖХ-МС	407
8.1.1. Области применения	408
8.1.2. Требования к ЖХ-МС	409
8.1.3. Основы ЖХ-МС	410
8.1.4. Сравнение условий градиентного элюирования для ЖХ-УФ и ЖХ-МС	415

8.1.5. Разработка методики для ЖХ-МС	417
8.1.6. Особенности ЖХ-МС	429
8.2. Ионнообменная хроматография (ИОХ).	438
8.2.1. Теория	439
8.2.2. Зависимость разделения от условий градиента	447
8.2.3. Разработка метода для градиентной ИОХ.	447
8.3. Нормально-фазная хроматография (НФХ)	450
8.3.1. Теория	451
8.3.2. Разработка метода для градиентной НФХ.	451
8.3.3. Хроматография гидрофильных взаимодействий (ГИХ)	453
8.4. Трехкомпонентные или четырехкомпонентные градиенты.	457
Литература	461
Глава 9. Теория и формулы	463
9.1. Модель линейного изменения элюирующей силы растворителя.	463
9.1.1. Удерживание	465
9.1.2. Ширина пика	472
9.1.3. Селективность и разрешение	478
9.1.4. Преимущества применения ЛИС-модели	480
9.2. Эффекты второго порядка	481
9.2.1. Определение значений ϕ и k	482
9.2.2. Неидеальное оборудование	490
9.3. Точность прогнозирования градиентной элюции.	494
9.3.1. Время удерживания в градиенте.	495
9.3.2. Предварительный расчет ширины пиков	498
9.3.3. Измерения значений S и $\log k_0$	498
9.4. Значения S	499
9.4.1. Оценка значения S исходя из свойств растворителя и экспериментальных условий	501
9.5. Значения N в градиентной элюции.	504
Литература	512
Приложение I. Приближение о постоянстве значения S в градиентном режиме	515
Приложение II. Определение условий изократического элюирования по результатам предварительного градиентного анализа	517
Приложение III. Оценка колонок с обращенно-фазным сорбентом в отношении селективности и размывания пиков	520
Литература	532
Приложение IV. Свойства растворителей, используемых в градиентной элюции	533
Литература	534
Приложение V. Теория препаративного разделения	535
V.1. Изократическое разделение	535
V.1.1. Влияние массы образца и условий разделения на ширину пика	536
V.1.2. Емкость колонки w_s	538

V.1.3. «Оптимальные» значения w_x/w_s и N_0 для разделения соприкасающихся пиков	539
V.1.4. Влияние объема пробы	540
V.2. Градиентный режим	540
V.2.1. Зависимость ширины пика от массы образца и условий разделения	541
V.2.2. Определение значения α	543
V.2.3. Определение массы образца для С-П-разделения	543
Литература	544
Приложение VI. Более подробно о хроматографии вирусов	545
VI.1. Структура аденовирусов	545
VI.2. Пробоподготовка	548
VI.3. Дополнительные сведения о хроматографической очистке вирусов . .	549
VI.4. Дополнительные сведения о хроматографическом анализе вирусов . .	549
Литература	550
Предметный указатель	551
Компания «Шимадзу Европа ГмбХ»: Увеличение эффективности и производительности работы аналитических лабораторий с помощью оборудования для ВЭЖХ-производства Shimadzu Corporation	568

Предисловие редактора перевода

Не так уж и часто выходят в свет фундаментальные монографии, посвященные самым различным аспектам градиентного элюирования. Еще реже их переводят на русский язык. На моей памяти и вовсе в первый раз. Теперь, когда количество людей, понимающих смысл и существительного «элюирование», и прилагательного «градиентная», и их сочетания, уменьшилось у нас до минимально возможного уровня и даже ниже его, такие книги стали особенно необходимы нашему хроматографическому сообществу. Безусловно, для чтения этой книги необходим не просто минимальный объем знаний по хроматографии, а как минимум два или три таких объема. Как пишут сами авторы в словаре условных обозначений и принятых сокращений, «если вы не знаете значения аббревиатуры ВЭЖХ, то эта книга не для вас». Но уж если знаете, то книга Л. Снайдера и Д. Долана станет для вас прекрасным справочным пособием по способам разработки методик градиентного ВЭЖХ-анализа самых различных классов соединений, вы узнаете, как сделать их воспроизводимыми и как (в случае необходимости) перенести их на другое хроматографическое оборудование. Подходы к разработке методик, анализ получаемых хроматограмм, оптимизация градиента, компьютерное моделирование — все это подробно рассматривается и сопровождается большим количеством полезных справочных таблиц со свойствами растворителей и реагентов. В книге самым тщательным образом изучаются принципы градиентного элюирования, сравниваются изократический и градиентный способы элюирования. Авторы успешно разрушают до сих пор бытующий среди хроматографистов миф о том, что нет ничего лучше, однозначнее, воспроизводимее и проще, чем изократический способ элюирования. Не обойдены вниманием и сложные, трех- и четырехкомпонентные градиенты. Что же касается главы, в которой рассматривается оборудование, то и тут хроматографист найдет для себя немало полезного: подробно освещены вопросы устройства градиентных систем, их тестирования, описаны возможные неисправности, способы их устранения и, что немаловажно, даны рекомендации по выбору градиентных систем из тех, что производятся в настоящее время. Такие рекомендации особенно полезно изучить до покупки хроматографической техники, а не после. Впрочем, и после, когда вы уже стали готовить систему к работе, когда озаботились, к примеру, минимизацией объемов задержки, прочесть эту главу будет совсем не лишним. Немало полезных сведений найдут читатели и в тех главах, где описываются области, смежные с основной темой книги. Например, такие как применение градиентного элюирования в жидкостной обращенно-фазной хроматографии (в сочетании с масс-спектральным детектированием),

в разделении крупных молекул от пептидов до белков и вирусов, в препаративной хроматографии. Следует обратить внимание еще на одну интересную особенность подачи материала в книге — указания авторов на то, что какие-то разделы и даже главы можно пропустить, если вас не интересуют теоретические подробности описания процесса, и сразу перейти к практическим рекомендациям. Таким образом, оказывается, что книга будет полезна не только для хроматографистов-исследователей, но и для практиков, которым нужно разработать конкретную методику анализа или процесс препаративного разделения.

Пользуясь случаем, переводчики хотели бы поблагодарить к.х.н. И.А. Петухова и И.В. Важнину за ценные замечания и помощь при подготовке рукописи перевода к печати.

к.т.н. М.Б. Бару

Предисловие

Сегодня высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, HPLC — High Performance Liquid Chromatography) широко используется при разделении и анализе веществ [1, 2]. Многие смеси невозможно успешно разделить, применяя только постоянные (изократические) условия разделения. Взамен этого используется *градиентная элюция* (так называемое *программирование растворителя*): изменение состава подвижной фазы во время разделения так, чтобы постепенно ослаблялось удерживание вещества. Чтобы полностью использовать преимущества такого градиентного режима, необходимо понимать принципы, лежащие в его основе, иметь представление о сходстве градиентного элюирования с изократическим и их различиях. Наши рекомендации по *высокоэффективной градиентной элюции*, приведенные в данной книге, вкупе с описанием самого современного оборудования, колонок и экспериментальных методик, способствуют такому пониманию. Поскольку обращенно-фазная жидкостная хроматография (ОФ-ЖХ, RP-LC — Reversed-Phase Liquid Chromatography) особенно важна, то будет обсуждаться именно она, за исключением отдельно оговоренных случаев (разделы 6.2.2, 8.8 и 8.3 посвящены градиентной элюции в ионообменной и нормально-фазной хроматографии).

В некоторых ранее опубликованных обзорах и книгах ([3—8] и главе 8 [2]) принципы и практическое применение градиентной элюции описываются в соответствии с представлениями, существовавшими во времена написания этих работ. Однако сейчас эти обзоры представляются устаревшими, неполными и/или излишне сложными для практического применения. Таким образом, эта книга была написана с тремя разными целями: а) краткое изложение того, что нужно знать читателю, чтобы осуществить на практике любое градиентное разделение; б) концептуальное изложение принципов градиентной элюции; в) детальное исследование базовой теории градиентного элюирования в приложении к особым случаям, позволяющее рассеять давнишний скепсис читателя. Так как многих читателей интересуют лишь практическое использование градиентной элюции или разработка градиентной методики, этому уделяется особое внимание.

О немногих из применяемых в настоящее время разнообразных хроматографических методов существовало ошибочное представление как о градиентной элюции, которая по-прежнему остается «загадкой, окутанной тайной и покрытой мраком неизвестности» [9]. В то время как «простое» изократическое разделение может вызывать трудности, в градиентной элюции добавляются еще и сложности, связанные с оборудованием, методиками, интерпретацией результатов

и стратегией разработки метода. По сравнению с изократическим разделением градиентное считается: а) экспериментально более проблематичным; б) по своей природе более медленным и менее устойчивым, а также в) представляющим определенную трудность при передаче метода из одних рук в другие. Из-за этих *потенциальных* нежелательных свойств градиентной элюции многие хроматографисты в прошлом по возможности избегали ее применения. Основная посылка этой книги заключается в том, что градиентная элюция может быть намного легче для понимания и практического применения, чем это казалось ранее.

Иногда может показаться, что градиентная элюция противоречит нашему предшествующему опыту работы в изократическом режиме разделения. Например, при изократической элюции двукратное снижение скорости потока или увеличение длины колонки в два раза приводят к удвоению времени удерживания и увеличению ширины пиков в 1,5–2 раза. Аналогичные изменения скорости потока или длины колонки при градиентном элюировании обычно вызывают значительно меньшие сдвиги в удерживании или ширине пиков. В изократической элюции изменение скорости потока или длины колонки не оказывает влияния на относительное расположение пиков на хроматограмме. Для градиентной элюции это далеко не всегда так — на самом деле градиентная элюция по природе своей «полна неожиданностей». Кроме того, изменения времен удерживания и разрешения веществ при изменении скорости потока, длины колонки или продолжительности градиента при хроматографии в градиентном режиме зависят от природы разделяемых соединений. В этой связи важно ввести классификацию образцов по свойствам, подразделив их на 4 группы: «правильные»/низкомолекулярные, «правильные»/высокомолекулярные, «неправильные»/низкомолекулярные и «неправильные»/высокомолекулярные. Градиентное элюирование каждого из этих четырех типов образцов рассматривается в этой книге, однако основное внимание уделяется низкомолекулярным образцам, и только глава 6 посвящена именно высокомолекулярным образцам с молекулярным весом более 1000 Да.

Существенное сходство изократической и градиентной элюции часто упускается из виду, но, однажды осознанное, оно намного облегчает понимание градиентного разделения, а также помогает «интуитивно» предугадывать, что произойдет после каких-либо изменений условий градиентного элюирования. В этой книге мы будем использовать модель *линейного изменения элюирующей силы растворителя*, ЛИС (LSS — Linear Solvent Strength (model)) [3, 5, 7] в качестве моста, соединяющего изократический и градиентный способы элюции. Такая модель также дает возможность достаточно точно выразить зависимость времени удерживания, ширины пиков и разрешения от условий градиента и, кроме того, использовать *компьютерное моделирование* для разработки методов

ВЭЖХ. Основываясь на данных двух и более экспериментальных градиентных разделений любых образцов, с помощью компьютерного моделирования можно прогнозировать результаты либо изократической, либо градиентной элюции в зависимости от условий, способствуя тем самым постоянному совершенствованию методов разделения. Компьютерное моделирование особенно полезно при разработке градиентного метода, и это широко используется в настоящем издании для наиболее наглядной демонстрации влияния различных экспериментальных условий на градиентное разделение. Мы также надеемся, что эта книга будет полезна и с «другой» стороны — лучшее понимание принципов градиентной элюции поможет усовершенствовать применение изократического разделения.

В начале книги (глава 1, раздел 2.1 и глава 3) обсуждается применение изократического и градиентного элюирования для типичных образцов (с молекулярным весом менее 1000 Да) с минимальными отступлениями для вывода важных уравнений и без упоминания менее значительных аспектов градиентной элюции. Разделы 2.2—2.4 дают концептуальную базу для подробного анализа и использования градиентной элюции. Эти разделы некоторые читатели (хотя, возможно, и не все) захотят прочесть прежде, чем ознакомиться с главой 3. В главе 4 обсуждается требуемое для градиентного элюирования оборудование. В главе 5 рассматриваются экспериментальные проблемы, которые могут возникнуть при градиентном элюировании, а также дается информация об устранении связанных с этими проблемами неполадок. В главе 6 выявляются важные отличительные признаки градиентной элюции при разделении макромолекулярных соединений, таких как крупные пептиды, белки, нуклеиновые кислоты, вирусы и другие природные и синтетические полимеры. В главе 7 подробнее, чем в предыдущих главах, обсуждается использование градиентной элюции в препаративных разделениях, т.е. при введении больших количеств образца для получения очищенного продукта. Глава 8 посвящена анализу: а) разделений с использованием градиентной элюции в комбинации с масс-спектроскопическим детектированием (ЖХ-МС, LC-MS — Liquid Chromatography-Mass Spectrometry); б) применения градиента в нормально-фазной и ионообменной хроматографии и в) использования сложных градиентов, образованных из трех и более растворителей. Глава 9 завершает и уточняет рассмотрение фундаментальных уравнений градиентной элюции, при этом, в частности, акцентируется внимание на так называемых «неидеальных» вкладах в градиентное разделение.

Настоящее издание предполагает некоторую осведомленность о принципах и практике использования ВЭЖХ [2]. Для быстрого и краткого ознакомления с сущностью градиентного элюирования читателю предлагается прочесть главу 1, раздел 2.1, главы 3 и 4 в данной последовательности, а затем обратиться по мере необходимости к главе 5 («Устранение неполадок»). При более глубоком

интересе к градиентному элюированию разделы 2.2—2.4 обеспечат дополнительные сведения наряду с некоторыми подробностями, представленными в главе 9. Биохимики, возможно, начнут с глав 1 и 3, а также раздела 6.2, в то время как для хроматографистов, имеющих дело с выделением чистых компонентов из смеси, будет полезна глава 7 («Препаративные разделения»). «План чтения» книги предлагается на рис. П.1. Жирным шрифтом на нем выделены основные аспекты градиентного элюирования.

Что неприятно, в том и пользы нет. Короче, занимайтесь, чем вам любо.

Уильям Шекспир, «Укрощение строптивой»
(перевод М. Кузнецова)

Это издание насыщено перекрестными ссылками на его разделы, что позволит читателю последовательно изучать интересующие темы или прояснять вопросы, которые могут возникнуть во время чтения. Поскольку обилие перекрестных ссылок способно отвлекать внимание, *рекомендуется в большинстве случаев игнорировать эти предложения перескакивать к другим частям книги.* Некоторые главы содержат части, представляющие скорее академический, чем практический интерес. Такие разделы в каждом случае четко обозначены (выделены *курсивом*), поэтому читатель может их при желании пропустить. Мы также снабдили книгу определениями всех используемых символов (раздел «Глоссарий»), а также исчерпывающим и подробным указателем.

Последние 30 лет наш основной исследовательский интерес был сфокусирован на градиентном элюировании. В течение этого времени мы работали вместе, чтобы лучше понимать и применять этот мощный экспериментальный метод. Кроме того, мы создали программное обеспечение (DryLab®) для более эффективного использования градиентной элюции многочисленными исследователями во всем мире («компьютерное моделирование»). У одного из нас (Л.Р.С) интерес к этой теме возник давно, еще в начале 1960-х годов. Таким образом, настоящее издание является итогом работы за длительный период, а также попыткой раскрыть данную тему наиболее полно и подробно. Мы надеемся, что книга принесет пользу практикующим хроматографистам всего мира. В течение последних 35 лет другой исследователь, Павел Жандера из университета в Пардубице, также посвятил большую часть своей научной карьеры изучению принципов и практики градиентного элюирования. Данная книга многим обязана его вкладу в эту область, и наше сотрудничество продолжалось после публикаций *его* книги по градиентной элюции в 1985 году [6] и последних обзоров по данной тематике [8].

Мы высоко ценим помощь наших четырех соавторов, которые отвечали за подготовку раздела 6.2.2.4 [Carl Scandella (Carl Scandella Consulting, Bellevue WA), Paul Shabram (Ventana Biosciences, San Diego, California) и Gary Vellekamp (Schering Plough Research Institute, Union, New Jersey)] и раздела 7.4 [Geoff Cox

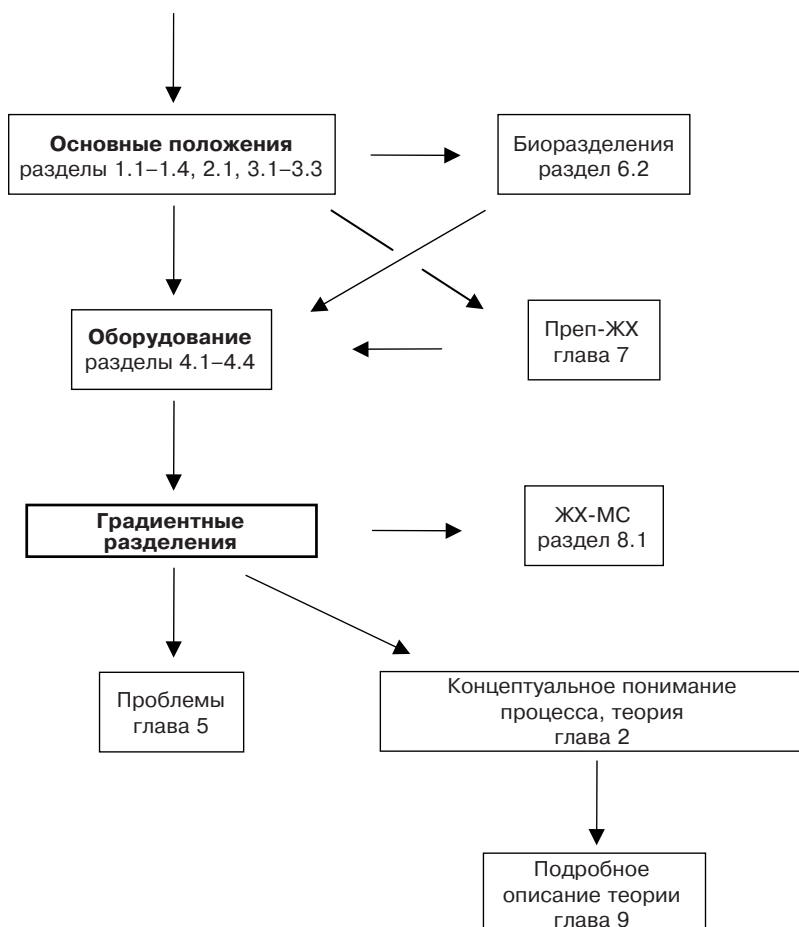


Рис. П.1. Как пользоваться этой книгой

(Chiral Technologies Inc., West Chester, Pennsylvania)]. Мы также благодарны ряду наших бывших сотрудников, которые оказали нам существенную помощь в исследовании градиентного элюирования: Geoff Cox, Pete Carr, Julie Eble, Russel Gant, Barbara Ghrist, Jack Kirkland, Tom Jupille, Dana Lommen, Dan Marchand, Imre Molnar, Thomas Mourey, Hans Poppe, Mary Ann Quarry, Bill Raddatz, Dennis Saunders, Marilyn Stadalius, Laurie Van Heukelem, Tom Waeghe и Peng-Ling Zhu. Наконец, мы чрезвычайно признательны нескольким рецензентам за их замечания до публикации этой книги: Geoff Cox, John Ford, Pavel Jandera, Tom Jupille, John Kern, James Little, Dan Marchand, Jim Merdink, Tom Mourey, Uwe Neue, Carl Scandella, Peter Schoenmakers, Mark Stone, Tim Wehr, Loren Wisley, Patrick Lukulay и Jianhong (Jane) Zhao. Некоторые из них любезно предоставляли оттиски или перепечатки собственных работ.

Литература

1. L. R. Snyder, HPLC: past and present, *Anal. Chem.* 72 (2000) 412A.
2. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2nd edn, Wiley-Interscience, New York, 1997.
3. L. R. Snyder, Principles of gradient elution, *Chromatogr. Rev.* 7 (1965) 1.
4. C. Liteanu and S. Gocan, *Gradient Liquid Chromatography*, Halsted Press, New York, 1974.
5. L. R. Snyder, Gradient elution, *High-performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives*, Vol. 1, Cs. Horváth, ed., Academic Press, New York, 1980, Chap. 4.
6. P. Jandera and J. Churáček, *Gradient Elution in Column Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1985.
7. L. R. Snyder and J. W. Dolan, The Linear-solvent-strength model of gradient elution, *Adv. Chromatogr.* 38 (1998) 115.
8. P. Jandera, Gradient elution in liquid column chromatography — prediction of retention and optimization of separation, *Adv. Chromatogr.* 43 (2004) 1.
9. Winston Churchill, *Radio Broadcast*, 1 October 1939 (из речи, посвященной политике России).

Ллойд Р. Снайдер

Джон У. Долан

Оринда, Калифорния

Амити, Орегон

Сентябрь 2006

Словарь условных обозначений и принятых сокращений

Этот раздел состоит из двух частей: основные символы и второстепенные символы. К второстепенным символам относятся обозначения, которые используются только один или два раза. Большинство обозначений, представляющих интерес, включены в список основных символов. Уравнения, служащие определением данного символа, указаны рядом с этим символом. Например, указание «уравнение (2.18)» отсылает к уравнению (2.18) главы 2. Приведены единицы измерения для всех обозначений, используемых в данной книге. Там, где определения или символы системы IUPAC отличаются от определений и обозначений, используемых в данной книге, указано соответствующее обозначение IUPAC (из ASDLID 009921), например t_M вместо t_0 .

Основные символы и принятые сокращения

<i>A</i>	кислотность водородных связей колонки; приложение III
<i>A</i> (растворитель)	подвижная фаза в начале градиента
ACN	ацетонитрил (Acetonitrile)
<i>b</i>	истинная скорость нарастания градиента, уравнение (2.11) (см. обсуждение в разделе 2.3.3)
<i>B</i> (растворитель)	подвижная фаза в конце градиента, процент <i>B</i> выражает объемный процент <i>B</i> в подвижной фазе
<i>B</i>	основность водородных связей колонки; приложение III
<i>C</i>	емкость катионообменной колонки; приложение III
<i>C</i>	концентрация соли противоиона в ИОХ (подразумевается одновалентный противоион)
(<i>C</i>) _f , (<i>C</i>) ₀	значение <i>C</i> в начале (o) и конце (f) градиента
<i>C</i> *	значение <i>C</i> в градиентной элюции (когда зона вещества находится в середине колонки)
<i>d_p</i>	размер микрочастиц сорбента, мкм
<i>F</i>	скорость потока, мл/мин
<i>G</i>	коэффициент градиентной компрессии; уравнение (9.36)
<i>G</i> ₁₂	соотношение ширин пиков до и после прохождения ступенчатого градиента через зону вещества на колонке, равно W_2/W_1 на рис. 9.4
GLP	правила надлежущей лабораторной практики (Good Laboratory Practice)
<i>H</i>	высота теоретической тарелки, мм; уравнение (9.58)
<i>H</i>	гидрофобность колонки; приложение III

НІС	хроматография гидрофобных взаимодействий (ХГВ) (Hydrophobic Interaction Chromatography)
НІІІС	хроматография гидрофильных взаимодействий (ГИХ) (Hydrophilic Interaction Chromatography)
НPLC	если вы не знаете значение этой аббревиатуры, то данная книга не для вас (ВЭЖХ) (High Performance Liquid Chromatography)
i.d.	внутренний диаметр колонки (мм)
ІЕС	ионообменная хроматография (Ion-Exchange Chromatography)
ІQ	сертификация оборудования при установке (проверка соответствия спецификации), раздел 5.1.1.1 (Installation Qualification)
k	коэффициент удерживания в изократическом режиме; уравнение (2.4) (ранее называвшийся фактором емкости)
k^*	коэффициент удерживания в градиентном режиме; равен значению k при достижении зоной вещества середины колонки; уравнение (2.13), рис. 1.7 (ранее использовался символ \bar{k})
$k^*(a)$, $k^*(b)$, и т.д.	значение k^* для пиков a , b и т.д.
k_c	значение k при элюции, рис. 1.7
k_i , k_j , и т.д.	значение k для пиков i , j и т.д, а также k_i — это значение k в определенный момент времени при продвижении вещества по колонке, уравнение (9.1)
k_0	значение k в начале градиента при градиентной элюции, уравнение (2.10), а также значение k при нанесении небольших количеств вещества в изократическом режиме в отличие от значения k для больших количеств образца (только в главе 7 и приложении V)
k_w	значение k при использовании воды в качестве подвижной фазы или 0%В (ϕ_0), экстраполированное значение
k_1 , k_2 , и т.д.	значение k для веществ 1, 2 и т.д., а также значение k при разных значениях ϕ (ϕ_1 и ϕ_2)
L	длина колонки, мм
LC	жидкостная хроматография (ЖХ) (Liquid Chromatography)
LCСC	жидкостная хроматография в критических условиях (ЖХК) (Liquid Chromatography under Critical Conditions)
LC-MS	жидкостная хроматография с масс-спектроскопическим детектированием (ЖХ-МС), раздел 8.1 (Liquid Chromatography — Mass Spectrometry)
LC-MS/MS	ЖХ-МС с тройным квадруполом масс-спектрометра, раздел 8.1 (LC-MS with triple quadrupole Mass Spectrometer)
LSS	линейное изменение элюирующей силы растворителя (ЛИС) — математическая модель, разделы 1.4.2, 9.1 (Linear-Solvent-Strength (model))
m	коэффициент стехиометрии в НФХ, уравнение (8.8), а также $ z $ в ИОХ
M	молекулярный вес растворенного вещества, также молярность противоиона в ИОХ
MeOH	метанол (Methanol)
MS	масс-спектрометр (МС) (Mass Spectrometric)
n	число пиков на хроматограмме образца, а также обозначение n -го олигомера в олигомерных образцах
N	число теоретических тарелок колонки (изократический режим), уравнение (2.5); а также исходный белок на рис. 6.4

N^*	число теоретических тарелок колонки (градиент), уравнение (2.20)
N_0	число теоретических тарелок колонки для малых количеств образца, уравнение (7.3)
NPC	нормально-фазная хроматография (НФХ) (Normal-Phase Chromatography)
ODS	октадецилсилил, C_{18} (Octdecylsilyl)
OQ	тест на соответствие оборудования техническим условиям производителя (или части этих условий), раздел 5.1.1.1 (Operational Qualification)
p	количественная оценка коэффициента градиентной компрессии G , уравнение (9.35)
P	перепад давления в колонке, psi. Обычно используется еще МПа (1 МПа = 145 psi), но не в этой книге (по IUPAC он обозначается как Δp)
PC	пиковая емкость, число пиков с $R_S = 1$, которые можно получить в течение одного разделения, см. рис. 2.13 (а) и сопроводительный текст (Peak Capacity)
PC_{req}	пиковая емкость, требуемая для разделения образца, содержащего n компонентов, см. рис. 2.13 (б) и соответствующий текст (ранее определяемый как PC^* (Required Peak Capacity for the Separation of a Sample containing n components))
prep-LC	препаративная жидкостная хроматография (преп-ЖХ) (Preparative Liquid Chromatography) (глава 7)
PQ	эксплуатационный тест на пригодность системы к стандартному режиму работы, раздел 5.1.1.1 (Performance Qualification)
psi	фунт на квадратный дюйм, см. P
QC	контроль качества (Quality Control)
r	относительное перемещение зоны по колонке во время градиентной элюции, уравнение (9.12)
R	равно $1/(1+k)$ (по IUPAC обозначается символом κ)
R_1, R_2	значения R для пиков 1 и 2 соответственно
RP-LC	обращенно-фазная жидкостная хроматография (ОФ-ЖХ) (Reversed-Phase Liquid Chromatography)
R_F	относительное перемещение пика по колонке после прохождения через нее объема подвижной фазы, равного объему колонки V_m , $R_F = 1/(1+k)$
R_S	разрешение двух примыкающих пиков, уравнение (2.6), рис. 2.1; а также см. уравнение (2.7) для изократического режима и уравнение (2.21) для градиентного режима. «Критическое» разрешение — это значение R_S для наименее разделяемой пары пиков на хроматограмме
S	постоянная в уравнении (1.2) для данного вещества и определенных экспериментальных условий, равна $d(\log k)/d\phi$
S	стерическое сопротивление колонки проникновению жидкости. приложение III
SA	площадь поверхности, m^2 ; уравнение (7.5) (Surface Area)
t	время после начала градиентного разделения, мин.; уравнение (9.2). А также время после окончания градиента, рис. 9.5 (а)
T-P	«соприкасающийся» пик; препаративное разделение, в котором допускается введение настолько большого количества образца, чтобы пик целевого продукта соприкасался со смежным пиком на хроматограмме, раздел 7.1 (Touching-Peak)
TFA	трифторуксусная кислота (ТФУ) (Trifluoroacetic acid)

THF	тетрагидрофуран (ТГФ) (Tetrahydrofuran)
t_D	время задержки системы («мертвое» время), равное V_D/F , мин.
t_{delay}	время запаздывания градиента, соответствующее начальной изократической элюции до старта градиента, мин.
t_{eq}	время уравнивания колонки между разделениями в градиентной элюции, равное V_{eq}/F , мин.
t_G	время градиента, мин.
t_0	«мертвое» время колонки, время удерживания неудерживаемых пиков, таких как тиомочевина (в системе IUPAC обозначается как t_M), мин.
t_R	время удерживания, см. рис. 2.1 и соответствующий текст, мин.
t'_R	уточненное время удерживания, равное $t_R - t_0$
$t_{R,a}$, $t_{R,b}$ и т.д.	значения t_R для пиков a , b и т.д.
$(t_R)_{\text{avg}}$	среднее значение t_R , см. рис. 3.2
ULQO	верхний предел количественных значений (Upper Limit Of Quantification)
USP	Фармакопея Соединенных Штатов Америки, АФ (United States Pharmacopoeia)
UV	ультрафиолет (УФ) (Ultraviolet)
V	объем подвижной фазы, поступивший в колонку к определенному моменту времени, мл, уравнение (9.1)
V_D	объем задержки оборудования («мертвый» объем), мл; объем потока между входом в градиентный миксер и входом на колонку (в системах со смешиванием на линии высокого давления)
V_{eq}	объем уравнивания растворителем А, используемый между разделениями в градиентной элюции, мл
V_m	свободный («мертвый») объем колонки, мл. $V_m = t_0F$; если не оговорено иначе, внутренний диаметр колонки принимается равным 4,6 мм. В этом случае $V_m \approx 0,001L$, где L — длина колонки в мм. В иных случаях $V_m \approx 0,0005 (i.d.)^2 L$, где даны $i.d.$ и L в мм (в системе IUPAC обозначается как V_M)
V_M	смешиваемый объем в градиентной системе, мл, табл. 9.2
V_R	объем удерживания, мл., $V_R = t_R F = V_m(1+k)$
V'_R	уточненный объем удерживания, мл, равен $V_R - V_m$
V_s	объем образца, мл
W	ширина пика у базовой линии, мин., рис. 2.1 (в системе IUPAC обозначается как W_b)
W_0	значения W для небольшого образца, уравнение (7.2)
$W_{1/2}$	ширина пика на половине высоты, рис. 2.1 (в системе IUPAC обозначается как W_h)
W_i , W_j и т.д.	значения W для пиков i , j и т.д.
w_s	емкость насыщения колонки, мг
W_{th}	вклад в W достаточно большого количества образца, мин., уравнение (7.2)
w_x	вес вводимого на колонку соединения x , мг
x	относительное передвижение зоны вещества по колонке, рис. 1.7. Также ширина зоны на рис. 9.3

x_i, x_j	значения x для растворенных веществ i и j
z	эффективный заряд вещества в пробе в ИОХ
α	коэффициент селективности в изократическом режиме, уравнение (2.8)
α^*	коэффициент селективности в градиентном режиме, когда разделяемая пара зон находится в середине колонки
α_0	значение изократического α или градиентного α^* для малых количеств образца
β	равно t_{G1} / t_{G2} , уравнение (9.48)
δt_R	изменение времени удерживания t_R из-за неполного уравнивания колонки или расслоения растворителей, а также погрешность при расчете t_R , уравнение (9.43)
$\delta\delta t_R$	разность δt_R двух примыкающих (соседних) пиков
Δt_R	разность времен удерживания двух пиков, мин., например уравнение (2.24а), рис. 3.2
$\delta\phi$	погрешность в расчете значения ϕ при элюции, уравнение (9.43)
$\delta\phi_m$	искажение профиля градиента в результате сглаживания, рис. 9.7 (а)
$\Delta\phi$	участок профиля градиента, равный конечному значению ϕ в градиенте (ϕ_f) за вычетом начального значения ϕ_0
ϕ	объемная доля растворителя В в подвижной фазе, равная 0,01%В
ϕ^*	значение ϕ подвижной фазы в тот момент, когда зона вещества находится в середине колонки
ϕ_0	значение ϕ подвижной фазы в начале градиента, например для градиента от 10 до 80%В $\phi_0 = 0,10$
ϕ_c	значение ϕ подвижной фазы в тот момент, когда зона вещества выходит из колонки
ϕ_f	значение ϕ подвижной фазы в конце градиента, например для градиента от 10 до 80%В $\phi_f = 0,80$
ϕ_c	значение ϕ при «критичном элюировании»
η	вязкость растворителя, см. табл. IV.1 приложения IV
2-D	двумерный

Группы Жандера и Шонмейкера (и некоторых других исследователей) использовали обозначения и символы, отличные от тех, которые применяли авторы в данной книге и предыдущих публикациях. Эквивалентные названия разных групп приводятся ниже.

<i>Жандера, Шонмейкера</i>	<i>Настоящее издание</i>
a	$\log k_w$
A	ϕ_0
B	$\Delta\phi/(Ft_G)$
B'	$\Delta\phi/t_G$
k_a	k_0
m	S

Дополнительные символы

ACTH	адренокортикотропный гормон (Adrenocorticotropic Hormone)
A_{HIC}	$d(\log k)/d(C_{\text{AS}})$, уравнение (6.7)
API	ионизация при атмосферном давлении (включая APCI и ESI) (Atmospheric Pressure Ionization)
amu	единица атомной массы, эквивалентная 1 Да (Atomic Mass Unit)
APCI	химическая ионизация при атмосферном давлении (ХИАД) (Atmospheric Pressure Chemical Ionization Interface)
ASF	фактор асимметрии пика (Peak Asymmetry Factor)
AU	единицы поглощения (Absorbance Units)
b_A, b_Z	значение b для первого пика A и последнего пика Z на хроматограмме (уравнения (2.23) и (2.23(a)))
BA	бензиловый спирт, рис. 7.13 (Benzyl Alcohol)
b^*	обозначение соединения на рис. 7.12
C	p -крезол, рис. 7.13, (p -cresol)
C_{AS}	концентрация сульфата аммония в ХГВ, уравнение (6.7)
D	полностью денатурированный нативный белок, рис. 6.4
Da	Дальтон, эквивалентный 1 amu
d_c	внутренний диаметр колонки, мм
ESI	ионизация электрораспылением (для МС) (ИЭ) (ElectroSpray Ionization Interface)
$E_T(30)$	мера полярности подвижной фазы, полученная из спектрометрических измерений, уравнение (9.51)
F_s	функция параметров колонки, уравнение III приложения III
h	высота пика (в относительных единицах), рис. 2.1, а также приведенная высота теоретической тарелки, уравнение (9.56)
$h_{1/2}$	половина высоты пика, рис. 2.1
H_0	значение H небольших образцов, уравнение (V.4) приложения V
H_{th}	вклад в значение H больших образцов, уравнение (V.2) приложения V
K	константа равновесия удерживания растворенного вещества
k_{ACN}	значение k чистого ацетонитрила в качестве подвижной фазы, уравнение (6.17)
$k_{\text{H}_2\text{O}}$	значение k воды в качестве подвижной фазы, уравнение (6.14)
k_i, k_j	значение k пиков i и j соответственно
$k_{0,A}, k_{0,Z}$	значение k_0 первого пика A и последнего пика Z на хроматограмме (уравнения (2.23) и (2.23(a)))
k_{wi}, k_{wj}	значение k_w пиков i и j
k_0	значение k при $C_{\text{AS}} = 0$ в ХГВ, уравнение (6.7)
$k_{2,5}$	значение k при $C_{\text{AS}} = 2,5$ М в ХГВ, уравнение (6.8)
LLE	экстракция жидкость-жидкость (Liquid—Liquid Extraction)
m_{HILIC}	$d(\log k)/d(\log \phi_{\text{H}_2\text{O}})$ в ГИХ, уравнение (6.14)
MRM	комплексный мониторинг реакции (МС/МС, раздел 8.1) (Multiple Reaction Monitoring)
MSD	масс-селективный детектор, одноквадрупольный масс-спектрометр (МСД) (Mass Selective Detector)

MTBE	метил- <i>трет</i> -бутиловый эфир (МТБЭ) (Methyl-T-Butylether)
m/z	отношение массы к заряду
P	фенол, рис. 7.13, (Phenol)
PD	частично денатурированный белок, рис. 6.4 (Partially Denatured Protein)
PE	2-фенилэтанол, рис. 7.13 (2-Phenylethanol)
PEEK	полиэфирэфиркетон, пластиковые капилляры, используемые для соединений в ВЭЖХ (Poly-Ether-Ether-Ketone)
p, q	константы в уравнении (6.19)
rhGH	рекомбинантный человеческий гормон роста (Recombinant Human Growth Hormone)
SC	калибровочный стандарт (Standard Calibrator)
S_{HIC}	равен $-2,5A_{\text{HIC}}$ в ХГВ, уравнение (6.8)
S_i, S_j	значение S для пиков i и j
SIM	селективный мониторинг ионов; также мониторинг одного иона (МС) (Selective Ion Monitoring)
SPE	твердофазная экстракция (ТФЭ) (Solid-Phase Extraction)
t_{G1}, t_{G2} и т.д.	значения t_G для хроматографических разделений 1, 2 и т.д.
$t_R(1), t_R(2)$	времена удерживания пиков 1 и 2 соответственно, мин.
$t_{R,A}, t_{R,Z}$	значения t_R для первого пика A и последнего пика Z на хроматограмме, мин.
W_b	значение W для пика b
W_i, W_j	ширина пиков i и j у базовой линии, мин
w_{xn}	«функция нагрузки» в преп-ЖХ, уравнение (V.3)
δk	погрешность расчетного значения k при элюции, уравнение (9.46)
Δx	часть длины колонки, уравнение (9.19), рис. 9.2
$\phi_A, \phi_B, \phi_{AB}$	значения ϕ подвижной фазы в емкостях A, B и смеси A и B , где объемная доля A равна ϕ_{AB} (раздел 1.3)
ϕ_{HIC}	определяется как $-(C_{AS} - 2,5) / 2,5$, уравнение (6.8)
$\phi_{\text{H}_2\text{O},f}, \phi_{\text{H}_2\text{O},0}$	значения $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ в начале (0) и конце (f) градиента в ГИХ
σ_g	площадь поверхности на единицу веса сорбента колонки (m^2/g), уравнение (7.5)
v	приведенная скорость, уравнение (9.57)
ψ	фазовое отношение (в IUPAC принят символ β)

ГЛАВА I

ВВЕДЕНИЕ

Начни с начала... и продолжай, пока не дойдешь до конца. Тогда остановись.
Льюис Кэрролл, «Алиса в стране чудес»
(перевод Бориса Заходера)

I.1. «Основная проблема элюирования» и необходимость градиентного элюирования

До применения градиентного элюирования разделение в жидкостной хроматографии проводили с помощью подвижных фаз постоянного состава или постоянной элюирующей силы, то есть в *изократическом* режиме. Изократическое разделение пригодно для многих соединений и представляет собой самый простой и удобный метод жидкостной хроматографии. Однако для некоторых соединений постоянный состав подвижной фазы не может обеспечить приемлемое разделение, как, например, при обращенно-фазной хроматографии (ОФ-ЖХ) девятикомпонентной смеси гербицидов (рис 1.1 (а, б)). Можно использовать более слабую подвижную фазу, такую как 50% ацетонитрил (50%B), либо более сильную подвижную фазу, 70% ацетонитрил (70%B). В случае 50% ацетонитрила (рис. 1.1 (а)) видно, что последние пики слишком уширены и имеют чрезмерно большое время удерживания. В результате время анализа сильно увеличивается (140 минут), а последние пики имеют слабый сигнал (в этом примере высота пика 9 составляет всего лишь 3% от высоты пика 1). Использование 70% ацетонитрила (1.1 (б)) частично устраняет два последних недостатка, но при этом возникает иная проблема: неудовлетворительное разделение первых трех пиков. Этот пример иллюстрирует *основную проблему элюирования*: неспособность изократической системы обеспечить адекватное разделение за приемлемый промежуток времени многокомпонентной смеси, содержащей вещества с большим разбросом по временам удерживания (пики с сильно отличающимися коэффициентами удерживания k).

Еще на раннем этапе развития хроматографии Цвет предложил практическое решение основной проблемы элюирования (цитируется в [1], а также см. [2]). Если начинать с более слабой подвижной фазы (например 50% ацетонитрил), то хорошее разделение первых пиков можно осуществить за разумный промежуток времени. Вслед за этим состав элюента можно изменить

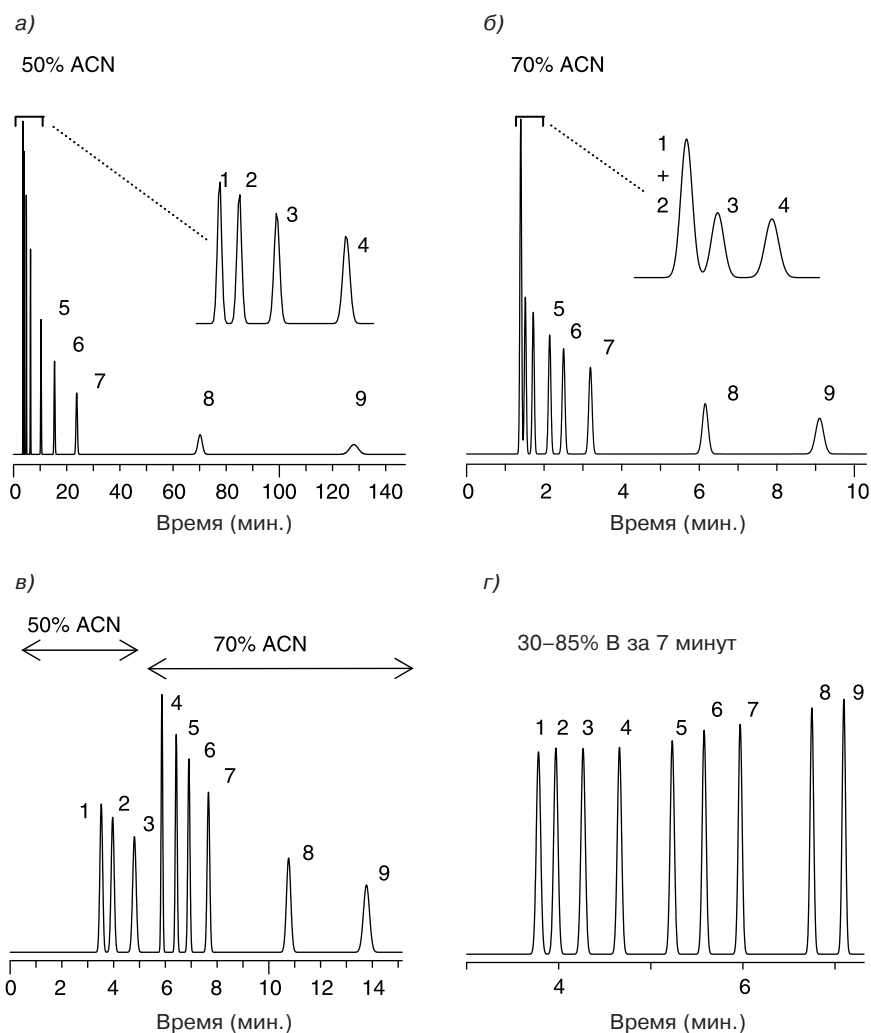


Рис. 1.1. Иллюстрация основной проблемы градиента и ее решение. Образец представляет собой смесь гербицидов, описанных в табл. 1.3 (площади всех пиков равны): (а) изократическое элюирование подвижной фазой 50% ацетонитрила; колонка C_{18} $150 \times 4,6$ мм (размер частиц 5 мкм), 2 мл/мин, температура окружающей среды; (б) условия те же, что и в (а) в качестве подвижной фазы 70% ацетонитрил; (в) условия те же, что и в (а) со ступенчатым элюированием 50% ацетонитрилом в течение 5 минут, затем 70% ацетонитрилом в течение последующих 10 минут; (г) условия те же, что и в (а) с градиентным элюированием 30–85% ацетонитрилом в течение 7 минут. Компьютерное моделирование основано на экспериментальных данных, представленных в табл. 1.3

(например 70% ацетонитрил) для ускорения элюции остальных компонентов смеси. Такая *ступенчатая* элюция (или «ступенчатый градиент») изображена на рис. 1.1 (в) для той же самой смеси, в тех же условиях. В этом случае все девять пиков разделены до базовой линии всего лишь за 15 минут анализа.

На рис. 1.1 видно явное преимущество ступенчатой элюции над изократическим разделением (рис. 1.1 (а, б)). Тем не менее этот метод не является идеальным решением основной проблемы элюирования. На рис. 1.1 (в) видно, что имеются значительные различия в ширине и интенсивности пиков, а также существенный разброс в расстояниях между пиками (в виде пустого пространства на хроматограмме). Для некоторых образцов подобный двухступенчатый градиент (рис. 1.1 (в)) мог бы быть решением проблемы элюирования, представленной на рис. 1.1 (а, б). Однако ступенчатые градиенты, во-первых, на практике сложно воспроизвести, а во-вторых, ступенчатый градиент является возможной причиной «раздвоения» пиков, то есть появления на хроматограмме двух пиков одного и того же вещества. *Градиентное элюирование* предполагает *непрерывное* изменение состава подвижной фазы в процессе разделения, благодаря чему последние пики становятся слабоудерживаемыми, так как процент более сильного растворителя постепенно увеличивается. Возможности градиентного элюирования продемонстрированы на рис. 1.1 (г), где видно, что все пики разделены до базовой линии за время анализа, составляющее всего лишь 7 минут, при этом ширина пиков и интенсивность сигналов практически одинаковы.

Во многих случаях преимущество градиентного элюирования над изократическим или ступенчатым может быть более ярко выраженным, чем это представлено на рис. 1.1. Градиентное элюирование в начале 1950-х годов подвергалось широкой критике, и многие ученые в течение нескольких лет высказывались в пользу ступенчатого элюирования (с. 39 в [3]). В течение нескольких лет после введения в практику в начале 1950-х годов градиентного элюирования относительные преимущества последнего широко оспаривались и многие исследователи предпочитали ступенчатое элюирование. Все же по многим причинам, в том числе рассмотренным выше, в настоящее время ступенчатое элюирование редко находит применение, за исключением специфических задач, например, касающихся препаративного выделения одного вещества, как это описано в разделе 7.3.2.1 и работе [4]. Несмотря на то что на практике ограничено применение такого вида градиента, оборудование, необходимое для выполнения оптимизированных многоступенчатых градиентов, описано в работе [5].

Первоначально идея градиентного элюирования появилась у Арне Тизелиуса (Arne Tiselius) в 1940-х годах, которую затем в 1950-х реализовал на практике А.Дж.П. Мартин (A.J.P. Martin) [6]. В начале 1950-х годов рядом независимых исследователей были проведены эксперименты по градиентному элюированию и описаны в работах [3, 7]. Основная заслуга дальнейшей разработки метода градиентного элюирования, по мнению Элбертона (Elberton), принадлежит Р.Дж.П. Уильямсу (R.J.P. Williams) из группы Тизелиуса (Tiselius) [8]. В конце 1960-х годов, вскоре после появления высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), стало доступно коммерческое оборудо-

вание для стандартной градиентной элюции. Более подробно с историей развития градиентного элюирования можно ознакомиться в работах [3, 7]. Понимание же принципа действия градиентного элюирования (который детально рассмотрен в главах 2 и 9) созревало медленнее.

Температурное программирование в газовой хроматографии (ГХ, GC — Gas Chromatography), которое используется для тех же целей, что и градиентное элюирование в жидкостной хроматографии (ЖХ, LC — Liquid Chromatography), развивалось практически в это же время (1952—1958) [9]. Теоретические описания этих двух процессов поразительно схожи, особенно если сравнить нашу работу и [10] — скорость, с которой изменяется состав подвижной фазы (ЖХ) или температура (ГХ), приводит к абсолютно аналогичным результатам [11, 12].

Помимо ступенчатого элюирования (рис. 1.1 (в)), были предложены и другие экспериментальные методы для решения основной проблемы элюирования: программирование скорости потока [13—15], программирование температуры [16, 17] и переключение колонок [18]. Однако по причинам, суммированным в табл. 1.1, ни один из этих альтернативных вариантов жидкостной хроматографии не способен обеспечить преимуществ градиентного элюирования при разделении различных образцов. Дальнейшее обсуждение и сравнение способов программирования приведено в работах [18, 19].

Таблица 1.1. Альтернативы градиентному элюированию

Метод	Способ реализации метода	Комментарии
Программирование скорости потока [13—15]	Увеличение скорости потока во время разделения	Для многих веществ имеет очень ограниченное применение. У пиков, элюируемых последними, значительно снижена высота и площадь ^а . Площади пиков меняются даже при небольших изменениях скорости потока. Использование этого метода ограничено допустимым давлением в системе.
Программирование температуры [16, 17]	Увеличение температуры во время разделения	Для многих веществ имеет очень ограниченное применение, так как температура оказывает меньшее влияние на удерживание по сравнению с изменением %В. Возможно разрушение образца к моменту разделения последних пиков, так как они элюируются при более высокой температуре. Многие колонки не допускают работы в широком диапазоне температур.
Переключение колонок [18]	Перенесение фракции образца с одной колонки на другую	Такие же недостатки, что и для ступенчатого элюирования. Более сложное аппаратное оформление. Плохо воспроизводимый способ перенесения фракции образца.

^аПри постоянной скорости потока масса вещества, содержащегося в объеме элюируемого пика, пропорциональна площади пика, умноженной на скорость потока. При изменяемой скорости потока последняя в течение времени элюирования каждого пика становится менее контролируемой, как и площадь пика.

1.2. Другие причины, побуждающие использовать градиентную элюцию

Помимо разделения самых разнообразных соединений, как, например, показанных на рис. 1.1, градиентная элюция находит применение и в ряде других случаев (табл. 1.2). Крупные молекулы, такие как белки или синтетические полимеры, невозможно разделить в изократическом режиме, так как их удержание на неподвижном носителе может быть чрезвычайно чувствительным к малейшим изменениям состава подвижной фазы (%В). Например, коэффициент удерживания k полистирола с молекулярной массой 250 кДа может меняться на 25% в результате изменения доли растворителя В в подвижной фазе всего лишь на 0,1% [21]. Такое поведение сильно затрудняет получение воспроизводимых результатов в разных лабораториях и даже внутри одной лаборатории. Более того, изократическое разделение смеси макромолекул обычно приводит к быстрой элюции некоторых компонентов смеси без разделения. При этом элюирование остальных компонентов образца задерживается настолько, что кажется, будто оставшиеся вещества уже никогда не вымоются с колонки. При градиентной же элюции времена удерживания макромолекул воспроизводятся намного лучше, чем в изократическом режиме, а их разделение может быть быстрым, эффективным и удобным (см. главу 6).

Таблица 1.2. Обоснования применения градиентного элюирования

Задачи	Область применения
Основная проблема элюирования	Образец содержит компоненты с самыми различными временами удерживания
Соединения, удерживание которых заметно изменяется из-за небольших изменений в составе подвижной фазы (процентное содержание В)	Крупные биомолекулы и синтетические полимеры
Универсальная методика разделения	Большое количество образцов с разнообразным и/или неизвестным составом; разработка методик разделения для каждого образца будет экономически невыгодной
Разработка эффективной методики	Все образцы; окончательный вариант методики может быть как градиентным, так и изократическим
Необходима предварительная пробоподготовка	Образцы, содержащие посторонние вещества, которые могут препятствовать разделению в условиях ВЭЖХ
Хвостящие пики	В образцах, при анализе которых наблюдаются хвостящие пики (такие как протонированные основания)

В некоторых случаях обращенно-фазной жидкостной хроматографии требуется единая методика разделения, которая может быть применима к разным

многокомпонентных смесям, например к соединениям *A*, *B* и *B* в образце 1 и соединениям *G*, *D* и *E* в образце 2. При этом каждый новый образец, как правило, анализируется один раз за фиксированный промежуток времени, без детальной разработки методики его разделения. Таким способом можно проанализировать сотни и тысячи разнообразных образцов за короткий промежуток времени и с минимальными затратами. Для универсальных методик разделения ОФ-ЖХ (с постоянным временем анализа в автоматическом режиме), применяемых обычно в комбинаторной химии [22] и анализе других образцов [23], наиболее подходящими являются методы градиентного элюирования. Такие анализы часто проводят в сочетании с масс-спектрометрическими (МС, MS — Mass Spectrometric) детекторами [24], которые позволяют не только проводить разделения уже известных компонентов пробы, но и идентифицировать ранее неизвестные соединения (раздел 8.1).

Разработку методики ВЭЖХ лучше начинать с одного или нескольких градиентных экспериментов (раздел 3.2). Прежде всего, для определения оптимального состава подвижной фазы (значения %В) следует провести предварительный градиентный анализ, который поможет избежать серии изократических разделений. Кроме того, предварительный градиентный анализ позволяет определить, какой вид элюирования (градиентный или изократический) будет лучшим для данного образца.

Многие смеси непригодны для непосредственного нанесения на колонку и последующего изократического элюирования. Как правило, такого рода образцы требуют предварительной обработки (пробоподготовки) [25] в целях удаления посторонних веществ и предотвращения накопления сильно удерживаемых компонентов на колонке. Однако в некоторых случаях градиентное элюирование способно минимизировать (или даже исключить) процедуру пробоподготовки. В качестве примера рассмотрим ВЭЖХ-анализ с УФ-детектированием (UV-detection — Ultraviolet detection) антрахинона из экстрактов целлюлозы [26]. Этот образец может быть разделен в изократическом режиме подвижной фазой, содержащей 20% метанола. При этом на хроматограмме возникает острый пик антрахинона, который хорошо отделяется от соседних пиков. Однако продолжительный изократический анализ этого образца приводит к постепенному ухудшению разделения из-за накопления (сорбции) на колонке сильно удерживаемых компонентов, которые для анализа не представляют интереса. *Можно* было бы удалить сильно удерживаемые компоненты предварительной обработкой образца перед ОФ-ЖХ-анализом. Однако применение градиентного режима (рис. 1.2) способствует вымыванию из колонки любых сильно удерживаемых веществ *во время* каждого разделения, продлевая таким образом срок эксплуатации колонки. В этом случае использование градиентного элюирования устраняет необходимость предварительной пробоподготовки и при этом сводится к минимуму износ колонки.

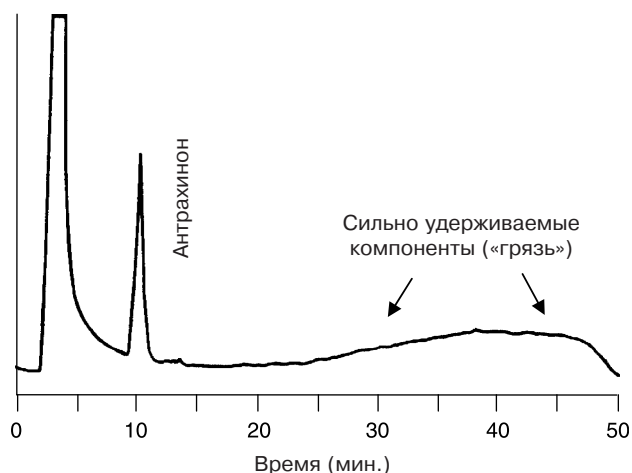


Рис. 1.2. Хроматограмма градиентного разделения, проводимого без предварительной пробоподготовки смеси. Проба представляет собой экстракт целлюлозы, содержащей антрахинон. Хроматографические условия: колонка C_{18} 250 × 4,6 мм (размер частиц 10 мкм); А — вода, В — метанол, 20—20—100—100%В за 0—15—20—25 минут [26]

Поначалу целью градиентной элюции являлось снижение размывания заднего фронта пиков, наблюдаемых в изократическом разделении [27]. Из-за повышения доли сильного растворителя в подвижной фазе во время градиента задний фронт пика движется быстрее по сравнению с передним фронтом, что и приводит к уменьшению его размывания и ширины пика. Такой эффект сжатия пика показан на рис. 1.3 при разделении образца с помощью анионообменной хроматографии: (а) изократический режим, (б) градиентный.

Отметим выраженное размывание заднего фронта пиков 12 и 13 (коэффициент асимметрии $ASF = 2-4$) в изократическом анализе (а) и их более симметричную форму (коэффициент асимметрии $ASF = 1,2$) в градиентном анализе (б).

1.3. Профиль градиента

Под профилем градиента обычно подразумевают динамику изменения состава подвижной фазы (%В ≡ объемного процента органического растворителя в ОФ-ЖХ) за время анализа. Как показано на рис. 1.4 (а—з), форма градиента может быть различной. Большинство методик по градиентному разделению представляют собой линейные градиенты (а), которые настоятельно рекомендуются при разработке новых методов. Нелинейные профили градиента (б, в) в прошлом применялись для разделения разнообразных образцов, однако в

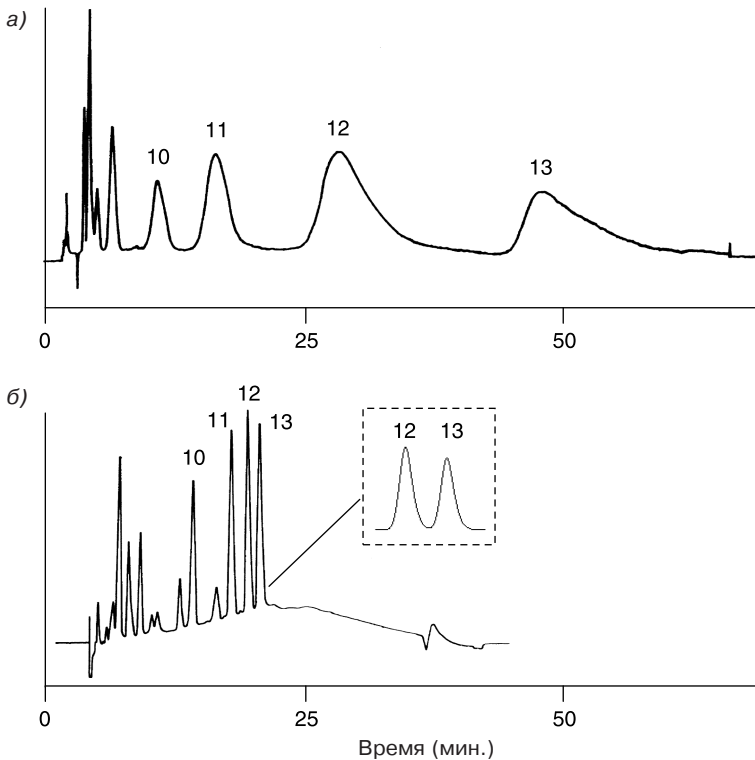


Рис. 1.3. Сжатие пиков при градиентном элюировании (б) и его отсутствие при изократическом элюировании (а). Разделение смеси ароматических карбоксильных кислот проводили методом анионообменной хроматографии. Хроматографические условия: (а) 0,055M NaNO₃; (б) градиент 0,01—0,10M NaNO₃ за 20 минут [28]

настоящее время их вытеснили кусочно-линейные градиенты (з), которые имеют не только все преимущества нелинейных форм, но и обеспечивают лучший контроль при разделении (а также избавляют от необходимости использования специализированного оборудования, формирующего градиент). Применение кусочно-линейных градиентов для улучшения разделения описано в разделе 3.3.4. Задержка градиента, или «изократическая задержка» (д), а также ступенчатый градиент (е) представлены на рис 1.4.

Линейная форма градиента может быть описана (рис. 1.4 (ж)) исходным и конечным составом подвижной фазы и временем, в течение которого происходит изменение состава элюента. Начальный и конечный состав подвижной фазы можно выразить в %В или с помощью объемной доли φ растворителя В в подвижной фазе (эквивалентной 0,01%В), то есть φ_0 и φ_f соответственно, объемная доля начального и конечного состава градиента.

Изменение %В или φ за время анализа называют *градиентным диапазоном* и обозначают $\Delta\varphi = \varphi_f - \varphi_0$. Здесь значения %В и φ взаимозаменяемы; то есть

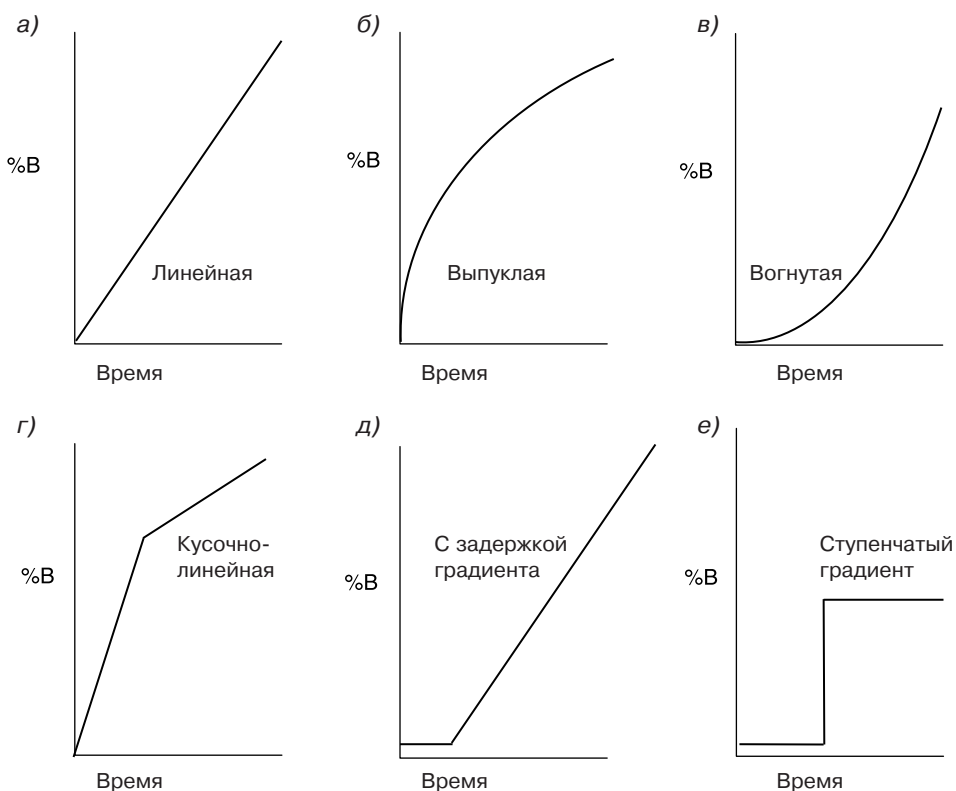


Рис. 1.4. Примеры различных профилей градиента (графики зависимости %V на входе в колонку от времени). Подробности в тексте

φ всегда соответствует 0,01%V, а 100%V означает, что в состав подвижной фазы входит только органический растворитель ($\varphi = \varphi_f = 1,00$). По причинам, обсуждаемым в главе 5, емкости *A* и/или *B* могут содержать смеси растворителей *A* и *B*, а не просто чистую воду и органический растворитель соответственно. Например, в емкости *A* будет находиться 5% ацетонитрил, а в емкости *B* — 95% ацетонитрил. В этом случае градиенту 0—100%V будет соответствовать изменение содержания ацетонитрила от 5 до 95%.

Под *градиентной программой* подразумевают описание изменения состава подвижной фазы с течением времени. Линейные градиенты представляют простейший случай, например градиент от 10 до 80%V за 20 минут (рис 1.4 (ж)), который также можно описать как 10—80%V за 0—20 минут (от 10%V в нулевой точке времени до 80%V в конечной точке времени). Программы кусочно-линейного градиента, как правило, выражают зависимость %V от времени для каждого линейного фрагмента, например 5—25—40—100%V за 0—5—15—20 минут (рис. 1.4 (з)).

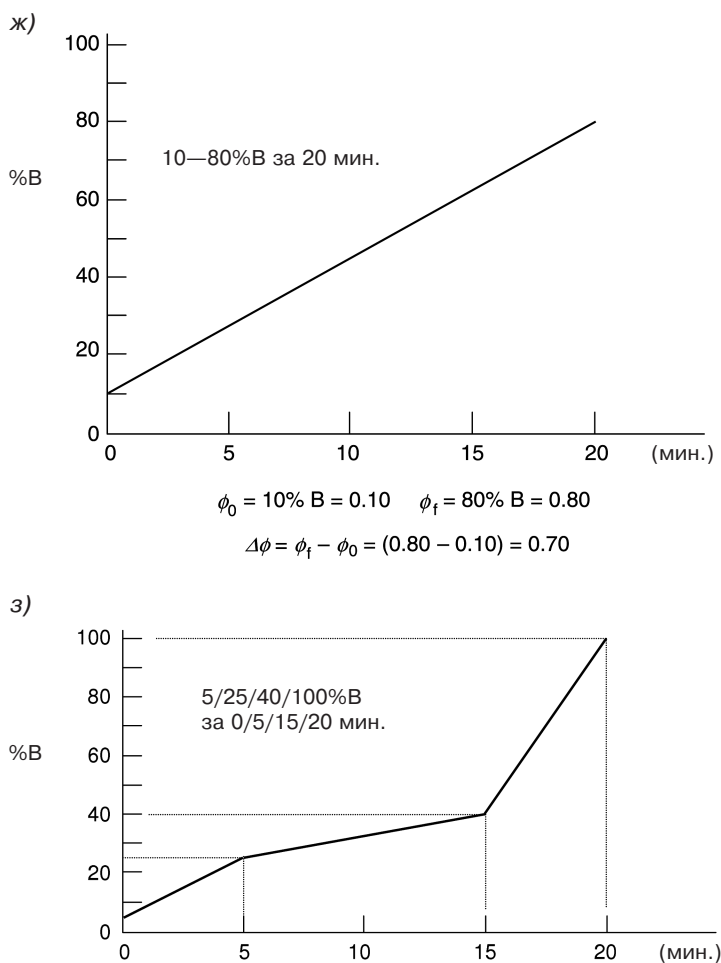


Рис. 1.4. Продолжение

1.4. Общие черты градиентного и изократического процессов

Изократический и градиентный режимы по существу аналогичны, что и явилось предпосылкой создания этой книги, поэтому хорошо изученные принципы изократических методов фактически могут быть использованы для исследования градиентного элюирования [25]. Это сходство изократического и градиентного режимов элюирования можно заметить в примерах на рис. 1.1. Видно, что ступенчатый градиент на рис. 1.1 (в) представляет собой комбинацию двух изократических разделений, изображенных на рис. 1.1 (а, б). Увеличение количества ступеней с двух (рис. 1.1 (в)) до большего количества в конечном счете превращает изократическое разделение в градиентное (рис. 1.1 (з)).

1.4.1. Сравнение изократического и градиентного элюирования

Перемещение зоны вещества по колонке происходит аналогичным образом как при изократическом, так и при градиентном элюировании (рис. 1.5 и 1.6 соответственно). Сначала рассмотрим рис. 1.5 изократического разделения, где показано положение мигрирующей зоны вещества в колонке с момента входа и до выхода из нее. На рис. (а) изображена зона вещества на входе в колонку сразу после ввода. После прохождения через колонку подвижной фазы в один объем колонки (б) зона вещества перемещается на одну треть длины колонки с некоторым размыванием (при этом относительное перемещение R_F равно $1/(1+k)$; на рис. 1.5 принято $k = 2$). Здесь k — коэффициент удерживания вещества (раздел 2.1.1). При элюировании объемом подвижной фазы, равным двум колоночным объемам (в), зона вещества сдвигается на две трети длины колонки, продолжая размываться. Когда же объем элюента становится равным трем объемам колонки (г), вещество достигает конца колонки и появляется в виде пика на хроматограмме (д); поскольку разделение проходит в изократическом режиме, доля растворителя В в элюенте (точечная линия на рис. 1.5 (д)) не меняется. Отметим, что при изократическом элюировании зона вещества перемещается по колонке с постоянной скоростью (пунктирная прямая линия на рис. 1.5, проведенная через центры всех зон).

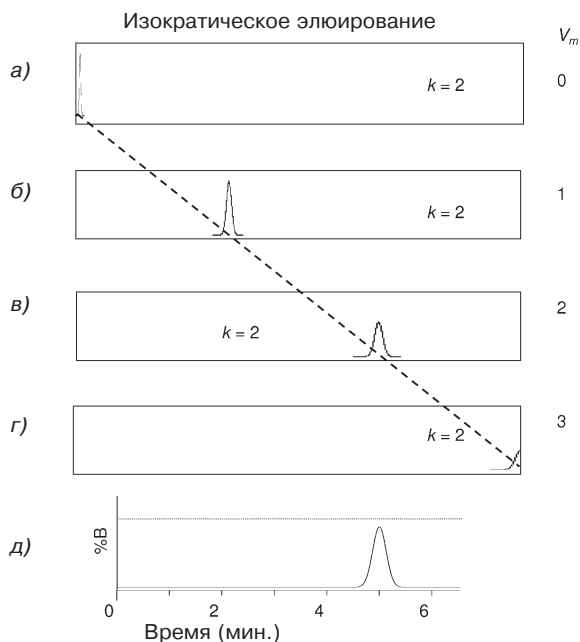


Рис. 1.5. Перемещение зоны вещества по колонке в изократическом элюировании

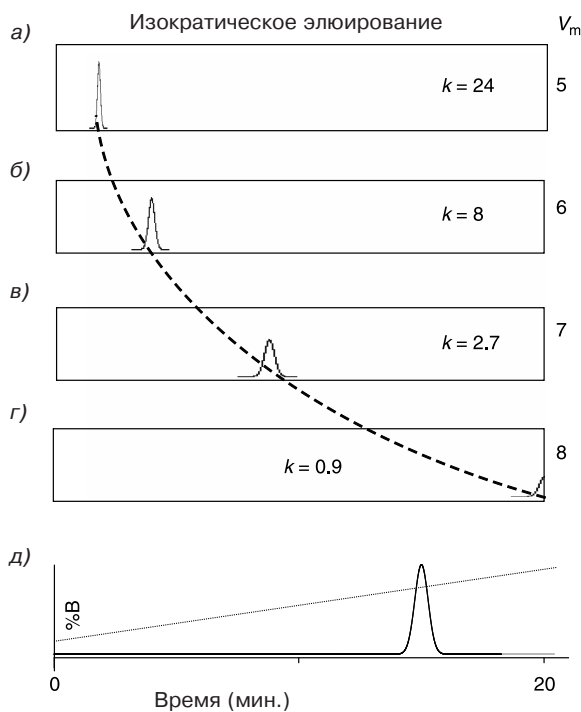


Рис. 1.6. Перемещение зоны вещества по колонке при градиентном элюировании

На рис. 1.6 изображено аналогичное разделение, но уже в градиентном режиме. Большинство соединений в пробе, разделяемой этим методом, в начале анализа «застывают» на входе в колонку вследствие их сильного удерживания в исходной подвижной фазе, имеющей низкую элюирующую силу. Однако по мере элюирования доля сильного растворителя в подвижной фазе постепенно повышается, а значение k мигрирующей зоны постепенно снижается.

На рис. 1.6 (а) показан момент после прохождения через колонку пяти объемов элюента. Из-за сильного удерживания в этой точке наблюдается лишь незначительное смещение зоны вещества. Ощутимое перемещение зоны по колонке с коэффициентом удерживания $k = 8$, сопровождающееся размыванием (б), происходит после элюции подвижной фазой, равной шести объемам колонки. С последующим объемом элюента (в) и средним значением $k = 2,7$ дальнейшее перемещение и размывание зоны становятся значительно больше вследствие увеличения элюирующей силы подвижной фазы. Наконец, после пропускания восьми колоночных объемов элюента (г) вещество вымывается из колонки и регистрируется в виде пика на хроматограмме (д). При этом доля растворителя В в подвижной фазе (прямая на рис. (д)) все время возрастает. Пунктирная кривая на рис. 1.6 показывает непрерывное ускорение движения пика по колонке во время градиентной элюции, в отличие от изократической, где скорость перемещения вещества остается постоянной (рис. 1.5).

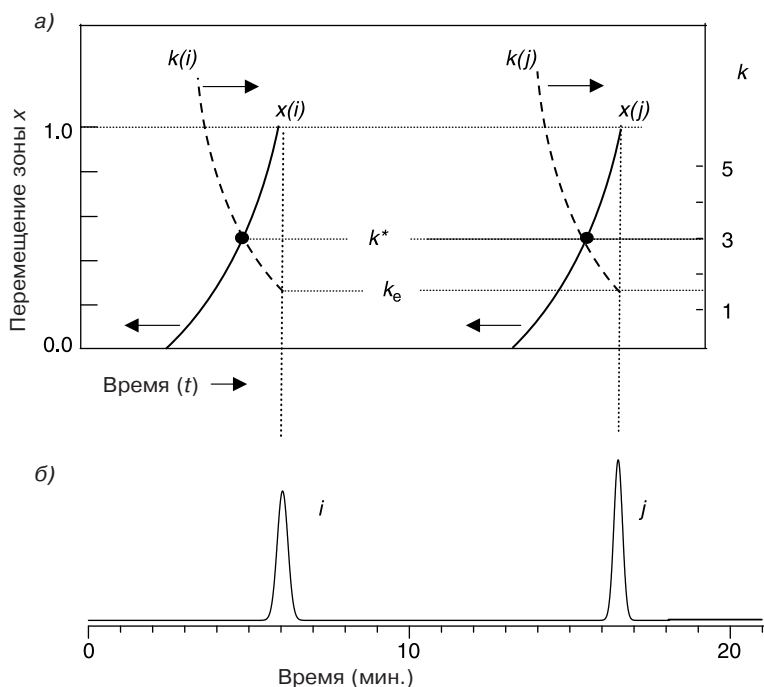


Рис. 1.7. Перемещение зоны в условиях градиентного элюирования; (а) графики перемещения зоны с указанием средних (k^*) и конечных значений k (k_e); (б) полученная хроматограмма

На рис. 1.7 представлен более сложный вариант примера, изображенного на рис. 1.6, для двух различных соединений (i и j), разделенных в градиентном режиме. Для начала обсудим результаты (рис. 1.7 (а)), полученные для соединения i , которое элюируется первым. Сплошная кривая [$x(i)$] показывает относительное перемещение зоны по колонке в зависимости от времени (при этом $x = 1$ по оси ординат соответствует вымыванию вещества из колонки; $x = 0$ соответствует положению зоны в начале процесса разделения). Такой характер движения подобен тому, что изображен пунктирной кривой на рис. 1.6, то есть ускорению перемещения вещества с течением времени или ростом зависимости кривой x от t . Кроме того, на рис. 1.7 показано текущее значение k для зоны i [пунктирная кривая " $k(i)$ "] по мере ее продвижения по колонке. Величина k_i — это такое значение k , которое бы было у вещества, если бы оно разделялось в данный момент времени в изократическом режиме, то есть состав подвижной фазы (%В) был бы таким же, как у подвижной фазы, контактирующей с веществом в данный момент. Далее, в главе 2, будет показано, что при градиентном элюировании удерживание и разрешение вещества зависят от среднего значения k (т.е. текущего значения k при смещении зоны на половину длины колонки и определяемого как коэффициент градиентного удержи-

вания k^*), а ширина пика зависит от значения k при вымывании пика из колонки (определяемого как k_e).

Сравнение двух соединений i и j (рис. 1.7 (а)) показывает сходство перемещения обеих зон по колонке, кроме отставания в элюировании зоны j . Отметим, что значения k^* и k_e как для слабо, так и для сильно удерживаемых веществ на хроматограмме остаются примерно такими же, как у i и j . Это указывает на то, что разрешение слабо удерживаемых веществ не снизится. Сравните градиентное разделение на рис. 1.1 (з) с изократическим на рис. 1.1 (б). Небольшие значения k (или k^*) обычно приводят к неудовлетворительному разделению (например первые четыре пика на рис. 1.1 (б)), а большие значения дают более качественное разделение (например восьмой и девятый пики на рис. 1.1 (б)). Одинаковые (большие) значения k^* в градиентном элюировании должны улучшать разделение каждого пика на протяжении всей хроматограммы. Значения k_e первых и последних пиков обычно также равны в градиентном элюировании. Это означает, что ширины первых и последних пиков будут на хроматограмме равными (что и наблюдается в градиентном разделении на рис. 1.1 (з)). *Относительное постоянство значений k^* и k_e в данном примере градиентного разделения обеспечивает явное преимущество градиентного элюирования над изократическим при разделении многокомпонентных образцов.*

1.4.2. Модель линейного изменения элюирующей силы растворителя (ЛИС)

В теории градиентного разделения модель линейного изменения элюирующей силы растворителя (ЛИС) основана на приближении к изократическому удерживанию в ОФ-ЖХ, зависящей от *силы растворителя*. Математически зависимость коэффициента удерживания k от объемной доли органического растворителя в подвижной фазе (%В) можно выразить как

$$\log k = a - b(\%B) \quad (1.1)$$

где a и b — обычно положительные константы для данного соединения, а изменяемая часть уравнения — %В. Уравнение (1.1) эмпирическое, упоминаемое во многих работах середины 1970-х годов [25], не говоря о его еще более раннем подтверждении в аналогичных исследованиях по тонкослойной хроматографии [29].

Графики уравнения (1.1) для девяти разных веществ (1—9) приведены на рис. 1.8 (а), а примеры графиков с отдельными точками данных — на рис. 6.1. Уравнение (1.1) чаще представляют в виде

$$\log k = \log k_w - S\phi, \quad (1.2)$$

где ϕ — доля органического растворителя в подвижной фазе ОФ-ЖХ (или %В, выраженный в десятичной форме; $\phi = 0,01\%B$), S — это константа для данного

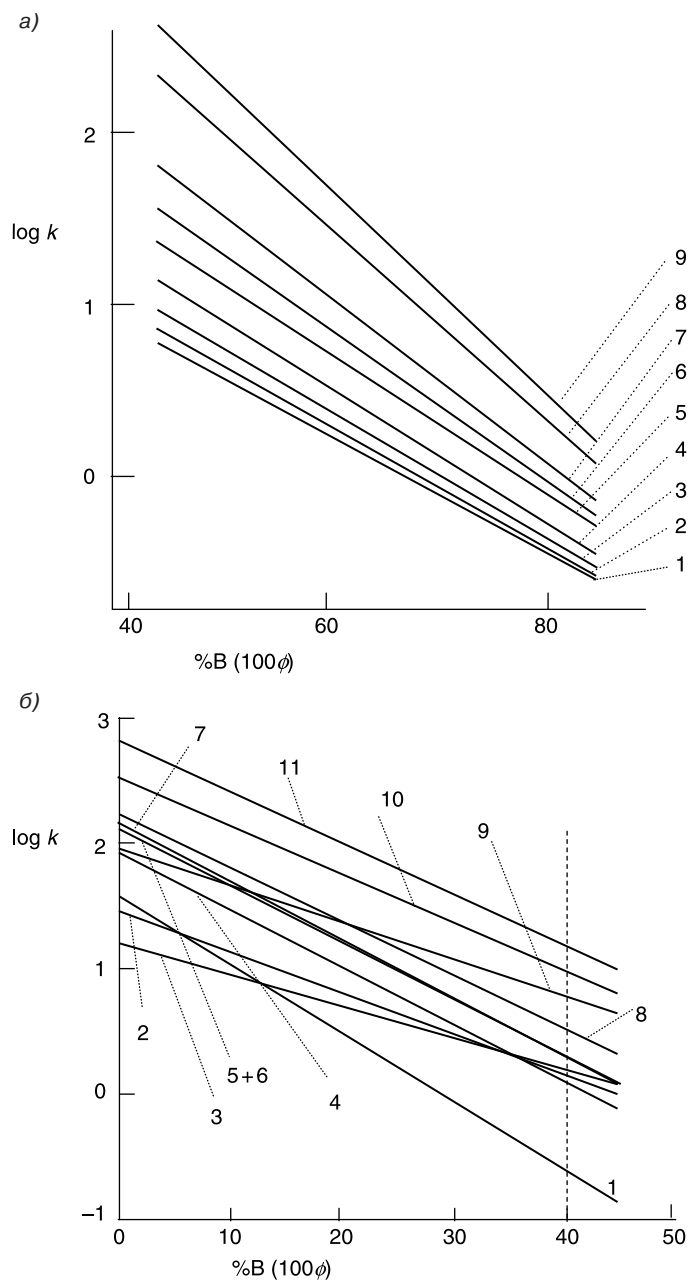


Рис. 1.8. Графики зависимости $\log k$ от %B а) для «правильных» и б) «неправильных» образцов, представленных в табл. 1.3. Условия хроматографии представлены в примечаниях к табл. 1.3

соединения при неизменных экспериментальных условиях (кроме φ), k_w — это экстраполированное значение k при $\varphi = 0$ (т.е. в качестве подвижной фазы выступает вода). Значения $\log k_w$ и S для соединений, охарактеризованных на рис. 1.8, представлены в табл. 1.3 («правильные» образцы).

Таблица 1.3. Значения $\log k_w$ и S для «правильных» и «неправильных» образцов, описанных в настоящей книге

«Правильные» образцы ^а			«Неправильные» образцы ^б		
Соединение	$\log k_w$	S	Соединение	$\log k_w$	S
Симазин	2,267	3,41	Фталевая кислота	1,58	5,46
Монолинурон	2,453	3,65	2-нитробензойная кислота	1,47	3,34
Метабромурон	2,603	3,746	4-хлоранилин	1,23	2,50
Диурон	2,816	3,891	2-фторбензойная кислота	1,90	4,46
Пропазин	3,211	4,222	3-нитробензойная кислота	2,12	4,55
Хлороксурон	3,602	4,636	2-хлорбензойная кислота	2,12	4,55
Небурон	3,920	4,882	3-фторбензойная кислота	2,17	4,61
Прометрин	4,731	5,546	2,6-диметилбензойная кислота	2,22	4,29
Тербутрин	5,178	5,914	2-хлоранилин	1,95	2,90
			3,4-дихлоранилин	2,52	3,80
			3,5-дихлоранилин	2,81	4,02

^аДанные заимствованы из работы [20]. Условия хроматографии: колонка C_{18} 5 мкм, подвижная фаза: смесь метанола с водой, температура окружающей среды.

^бДанные заимствованы из работы [38]. Условия хроматографии: колонка C_{18} 5 мкм, подвижная фаза: смесь ацетонитрила с буфером 25 мМ цитрат (рН 2,6), 32,1 °С.

В условиях линейного градиента (рис 1.4 (а), (ж)) доля растворителя В в подвижной фазе меняется со временем по уравнению

$$\%B = c + dt, \quad (1.3)$$

где c и d также являются константами. Объединяя уравнения (1.1) и (1.3), получим:

$$\log k = a - bc - bdt \equiv (\text{const}) - (\text{const})t. \quad (1.4)$$

Здесь k имеет такое значение, которое было бы у вещества на входе в колонку при изократической элюции подвижной фазой состава φ в момент времени t (в данном случае перемещением зоны вещества в ходе градиента пренебрегаем). Градиент, в котором коэффициент удерживания можно описать уравнением (1.4), называется градиентом *линейной силы растворителя*. Во время градиентного анализа с помощью уравнения (1.4) можно предсказать линейное падение значений $\log k$, зависящего от времени или от объема подвижной фазы на

выходе из колонки (или на входе в нее). Уравнения (1.2) и (1.4) никогда не выполняются строго, особенно при больших значениях k или φ , тем не менее уравнение (1.4) позволяет на практике достоверно предсказать результаты разделения в градиентном режиме. Преимущества линейного градиента и описывающего его уравнения (1.4) заключаются, во-первых, в простом определении констант $a-d$, откуда следует количественное прогнозирование результатов разделения, и, во-вторых, в возможности с помощью уравнения (1.4) связать градиентное разделение с соответствующим ему изократическим. В итоге хроматографисты, имеющие опыт в разработке и применении изократических ОФ-ЖХ-методик, могут использовать эти знания в создании и усовершенствовании соответствующих градиентных методик. Распространение ЛИС-модели на иные методы, чем обращенно-фазная ВЭЖХ, возможно с учетом небольшой потери в достоверности и чуть большей сложности в математических преобразованиях (см. разделы 8.2 и 8.3).

Если уравнение (1.4) объединить с фундаментальным уравнением градиентного элюирования (уравнение 9.2, глава 9), то можно точно предсказать время удерживания, ширину пика и разрешение, зависящие от условий эксперимента, и выразить эти результаты в единицах, эквивалентных единицам, используемым в изократическом элюировании. Рассмотрим очень важную взаимосвязь: зависимость значений градиентного коэффициента удерживания k^* (рис. 1.7) от условий градиента. В главе 2 мы покажем, что уравнение (1.5), приведенное ниже, может быть применено для удобного сравнения градиентного и изократического разделений. *Обсуждение, приведенное в следующих трех параграфах [заканчивая параграфом, содержащим уравнение 1.7], может быть пропущено, если есть в первую очередь заинтересованность в практическом применении градиента, а не в рассмотрении его основополагающих принципов.*

На рис. 1.6 значение k при достижении зоной вещества середины длины колонки (k^*) определяют по скорости изменения k в процессе перемещения зоны по колонке. В этом можно убедиться, сравнив рис. 1.6 и 1.9. На рис. 1.6 значение k^* снижается в 3 раза после прохождения через колонку каждого последующего объема подвижной фазы. В результате зона достигает середины колонки со значением $k^* \approx 2$ (рис. 1.6). На рис. 1.9 изменение значения k происходит медленнее (т.е. градиент приобретает более пологую форму) всего лишь с 1,5-кратным падением k с каждым последующим объемом элюента. В конечном итоге $k^* \approx 4$. То есть при медленном изменении k в ходе градиента значение k для вещества, находящегося на середине колонки (k^*), будет больше по сравнению с экспериментом, в котором профиль градиента более крут. Бóльшее значение k^* при более медленном изменении k обусловлено (при данном изменении %В или φ) бóльшим объемом подвижной фазы, проходящим через колонку, для смещения зоны вещества. Поэтому чем быстрее вещество будет перемешаться вдоль колонки (с изменением φ), тем скорее оно

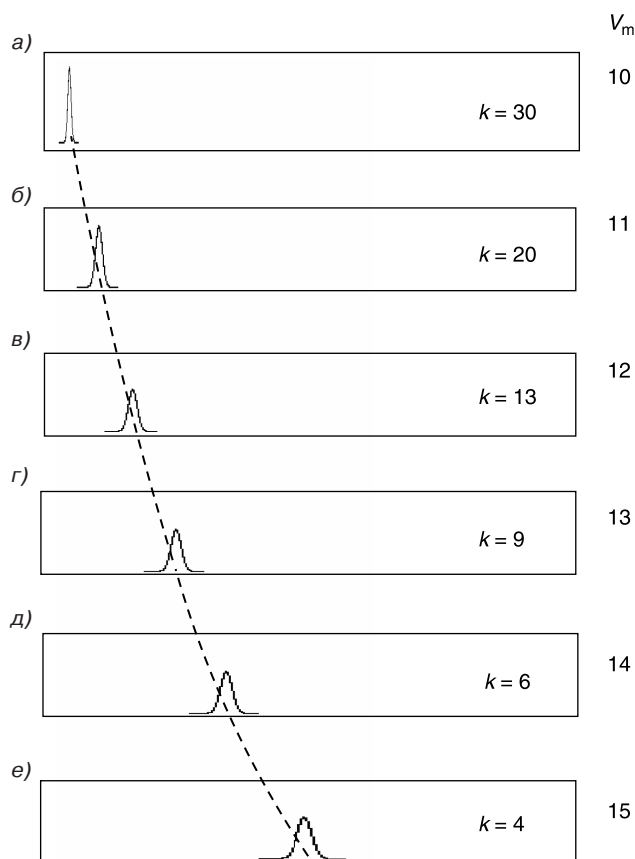


Рис. 1.9. Перемещение зоны по колонке при градиентном элюировании (более пологая форма градиента и медленное перемещение зоны по сравнению с рис. 1.6)

достигнет середины длины колонки с меньшим значением φ сопредельной подвижной фазы и с бóльшим значением $k = k^*$ (т.е. уравнение 1.2). В предельном случае, при самом пологом градиенте или постоянном значении k в ходе перемещения пика (т.е. при изократическом режиме), значение k^* равно значению k в начале элюции (наибольшее возможное значение k^* при градиентном элюировании).

И, наоборот, при более быстром изменении k в градиентном элюировании значение k^* будет меньшим. Таким образом, значение k^* определяется скоростью изменения k в градиентном процессе, или *степенью нарастания градиента*. Чем круче профиль градиента, тем меньше значение k^* . Такая картина градиентного режима приводит к основному определению скорости изменения градиента, а именно скорости изменения $\log k$ на каждый объем подвижной фазы, проходящей через колонку. Последнюю величину назовем *истинной скоростью нарастания градиента* b . Величина b , следовательно, определяется

по полному изменению $\log k$ во время градиента, деленному на количество колоночных объемов подвижной фазы, которая прошла через колонку во время градиента (t_G/t_0). Изменение φ в ходе градиента (конечное значение φ минус начальное) обозначим как $\Delta\varphi$. Таким образом, изменение $\log k$ за время градиента равно $\Delta\varphi S$ (разница в значениях $\log k$ при начальном и конечном значениях φ ; уравнение 1.2). Следовательно, значение b можно определить из выражения $(\Delta\varphi S) / (t_G/t_0)$, или

$$b = t_0 \Delta\varphi S / t_G. \quad (1.5)$$

Поскольку «мертвое» время колонки $t_0 = V_m/F$, где F — скорость потока, уравнение (1.5) можно преобразовать в

$$b = V_m \Delta\varphi S / t_G F. \quad (1.6)$$

Для всех веществ, кроме слабо удерживаемых, в условиях градиентной элюции можно записать $k^* = 1/1,15b$ (раздел 9.1.1), где значения k^* обуславливают ширину пика и его разрешение.

Отметим, что значение b в уравнении (1.6) определяется условиями градиента ($\Delta\varphi$, t_G), «мертвым» объемом колонки V_m , скоростью потока F и параметром S из уравнения (1.2). Значения S для конкретного образца и условий разделения можно получить либо с помощью двух изократических измерений с разными φ (уравнение 1.2), либо двух градиентных разделений с разным временем градиента (раздел 9.3.3). Это позволит вычислить значения b и k^* для каждого вещества в каждом из двух градиентных анализов, которые могут быть использованы для предсказания градиентного разделения в зависимости от экспериментальных условий. В последующих главах будет показано, что истинная скорость нарастания градиента b очень важна для понимания градиентного элюирования.

Значения S в ОФ-ЖХ можно приблизительно определить (раздел 6.1.1) по уравнению

$$S \approx 0,25(\text{молекулярная масса})^{1/2}, \quad (1.7)$$

поэтому среднестатистические маленькие молекулы с молекулярными весами около 200 имеют $S \approx 4$, в то время как большие молекулы — большее значение S ; например $S \approx 11$ для вещества с молекулярной массой 2000. Макромолекулы, такие как белки, ДНК или синтетические полимеры (с молекулярной массой более 10^4), могут иметь очень большие значения S , что сильно влияет на их градиентное разделение (глава 6).

Некоторые потенциальные преимущества модели ЛИС впервые обнаружили в 1964 году [30], а сама модель, описанная в этой главе, развивалась в течение последующих 35 лет [31–34]. Более подробную информацию, детальное рассмотрение, современный взгляд на эту концепцию и ее применение к градиентному элюированию можно найти в главах 2 и 9.

1.5. Компьютерное моделирование

Модель ЛИС позволяет достоверно рассчитать результаты градиентного разделения в зависимости от условий эксперимента (главы 2 и 9). Таким образом, можно предсказать, как повлияют на разделение: (а) скорость нарастания градиента (%В/мин), (б) исходный и конечный процент органической фазы в элюенте, (в) профиль градиента, (г) скорость потока и (д) размеры колонки. При этом другие условия, такие как температура, рН подвижной фазы, остаются постоянными. Для оценки градиентного элюирования таким способом требуется определить значения k_w и S для каждого соединения в образце (уравнение 1.2). Последние можно получить из двух градиентных разделений данного образца, различающихся только по времени градиента t_G (раздел 9.3.3). Для компьютерного моделирования используются предварительные вычисления, основанные на результатах двух и более градиентных разделений (экспериментальные «калибровочные разделения»), чтобы затем прогнозировать результаты изократической или градиентной элюции в зависимости от экспериментальных условий. Компьютерное моделирование начинается с введения (а) экспериментальных данных, полученных при проведении калибровочных разделений, и (б) условий разделения. Затем программа определяет значения k_w и S для каждого соединения в образце, и после этого можно вычислить результаты разделения как функцию от вышеперечисленных (или иных) экспериментальных условий. Таким образом, процесс разработки методики градиентной ОФ-ЖХ может быть более эффективным и менее дорогостоящим, а полученная методика — более совершенной. Более подробно все это, также как и некоторые примеры компьютерного моделирования, описано в разделе 3.4.

Компьютерное моделирование удобно при демонстрации различных принципов градиентного элюирования и поэтому будет широко нами использовано (DryLab®software, Rheodyne LLC, Rohnert Park, CA, USA [35—37]). Выбирая различные образцы, можно имитировать модельные хроматограммы, на которых хорошо видно, что происходит при изменении условий градиента. Так как предсказанные с помощью компьютерного моделирования результаты разделения, как правило, достаточно достоверны (раздел 9.3), то их можно принимать в расчет наравне с соответствующими экспериментальными разделениями. Хроматограммы, представленные в данной книге, получены с помощью компьютерного моделирования, если не приведена ссылка на литературный источник (для «реальных» хроматограмм).

1.6. Классификация образцов

Как мы уже видели, образцы могут отличаться по двум существенным признакам: по типу («правильные» и «неправильные») и молекулярному весу (меньше или больше 1000 Да). Природа образца, определенная по этим критериям, играет важную роль в оценке градиентного разделения в зависимости от экспериментальных условий. В настоящей книге в основном представлены образцы с низкой молекулярной массой (<1000 Да). Разделение высокомолекулярных образцов рассмотрено в главе 6. Определение того, что подразумевает тип образца, и некоторые следствия этого определения для градиентного элюирования мы рассмотрим ниже.

1.6.1. Образцы соединений с родственной структурой («правильные образцы»)

Для соединений с близкородственной структурой (например гомологов) графики зависимости $\log k$ от %В различаются между собой одинаковым образом, как это видно на рис. 1.8 (а). Мы будем считать такой тип образцов «правильными», в отличие от «неправильных» образцов, показанных на рис. 1.8 (б) (отметим, что данное определение «правильных» образцов отличается от используемого в работе [25]). Относительное удерживание «правильных» образцов не меняется при изменении %В в изократическом элюировании. Таким образом, независимо от процента органического растворителя в подвижной фазе порядок элюирования веществ, составляющих образец, всегда будет таким: $1 < 2 < 3 < \dots < 9$ (рис. 1.8 (а)). В главе 2 мы увидим, что также не меняется относительное удерживание компонентов «правильного» образца при изменении условий градиента (например, рис. 2.5). В данной книге в качестве «правильного» образца представлена конкретная смесь, состоящая из девяти гербицидов (производных фенилмочевины и триазина), перечисленных в табл. 1.3. Зависимости их удерживания от %В показаны на рис. 1.8 (а) (этот «правильный» образец также использовался в качестве примера на рис. 1.1). Результаты разделений этой смеси в зависимости как от изократических, так и от градиентных условий будут проиллюстрированы в следующих главах.

1.6.2. Образцы соединений с неродственной структурой («неправильные образцы»)

Образцы, содержащие соединения с различной структурой, часто демонстрируют «неправильное» удерживание при изменении %В в отличие от «правильных» образцов, изображенных на рис. 1.8 (а). На рис. 1.8 (б), иллюстри-

рующем «неправильные» образцы из табл. 1.3, видно, что с изменением %В изменяется относительное удерживание. Такое различное поведение «правильных» и «неправильных» образцов еще очевиднее на рис. 1.10 в ходе разделения соединений 1—7 «правильного» образца (а) и (б) и разделения соединений 1—5 «неправильного» образца (в) и (г). При изменении подвижной фазы от 40% до 60%В в «правильном» образце пики на хроматограмме начинают сближаться, но их последовательность сохраняется той же (б): $1 < 2 < 3 < 4 < 5 < 6 < 7$. При разделении «неправильного» образца последовательность удерживания веществ нарушается при изменении состава подвижной фазы от 20% до 40%В: при 20%В последовательность была такова: $1 < 3 < 2 < 4 < 5$. При увеличении силы растворителя до 40%В удерживание веществ стало другим: $1 < 2 = 4 < 3 < 5$. Таким образом, изменяя содержание буфера В в подвижной фазе, можно изменить порядок элюирования веществ «неправильного» образца (что не касается «правильных» образцов), а главное — улучшить разрешение (сравните рис. 1.10 (в) и (г)). Во второй главе мы увидим, что изменение условий градиента также приводит к значительным изменениям в последовательности разделения «неправильных» образцов (рис. 2.10 и 2.16), как и под влиянием изменения %В на рис. 1.10 (в, г). В последующих главах мы сравним градиентное разделение «правильных» и «неправильных» образцов при изменении различных экспериментальных условий (например длины колонки, скорости потока, времени градиента и его диапазона). *Важно отметить*, что делать вывод о «неправильности» компонентов образца по их «структурному сходству» обычно не следует. Как будет показано далее, «правильность» и «неправильность» образца лучше определять по их поведению в процессе хроматографического разделения, а не по молекулярной структуре; если существуют заметные изменения в относительном удерживании при изменении продолжительности градиента, тогда образец следует отнести к классу «неправильных».

Графики зависимости $\log k$ от %В для индивидуальных соединений «правильного» образца (как на рис. 1.8 (а)) имеют углы наклона (значения $S = d(\log k) / d\phi$), равномерно возрастающие к более удерживаемым соединениям (с большими значениями k_w). Такая закономерность, однако, не наблюдается у «неправильных» образцов (рис. 1.8 (б)). Это видно из рис. 1.11 с «правильными» (а) и «неправильными» (б) соединениями из табл. 1.3. Зависимости значений S от $\log k_w$ у «правильных» образцов имеют высокую степень корреляции ($r^2 = 1,00$), в то время как аналогичный график у «неправильного» образца показывает ощутимый разброс ($r^2 = 0,08$).

Специально подобранные «правильный» и «неправильный» образцы, представленные в табл. 1.3, будут широко использованы в последующих главах в качестве характерных примеров каждого из этих типов (все разделения этих образцов, показанные в книге, получены с помощью компьютерного

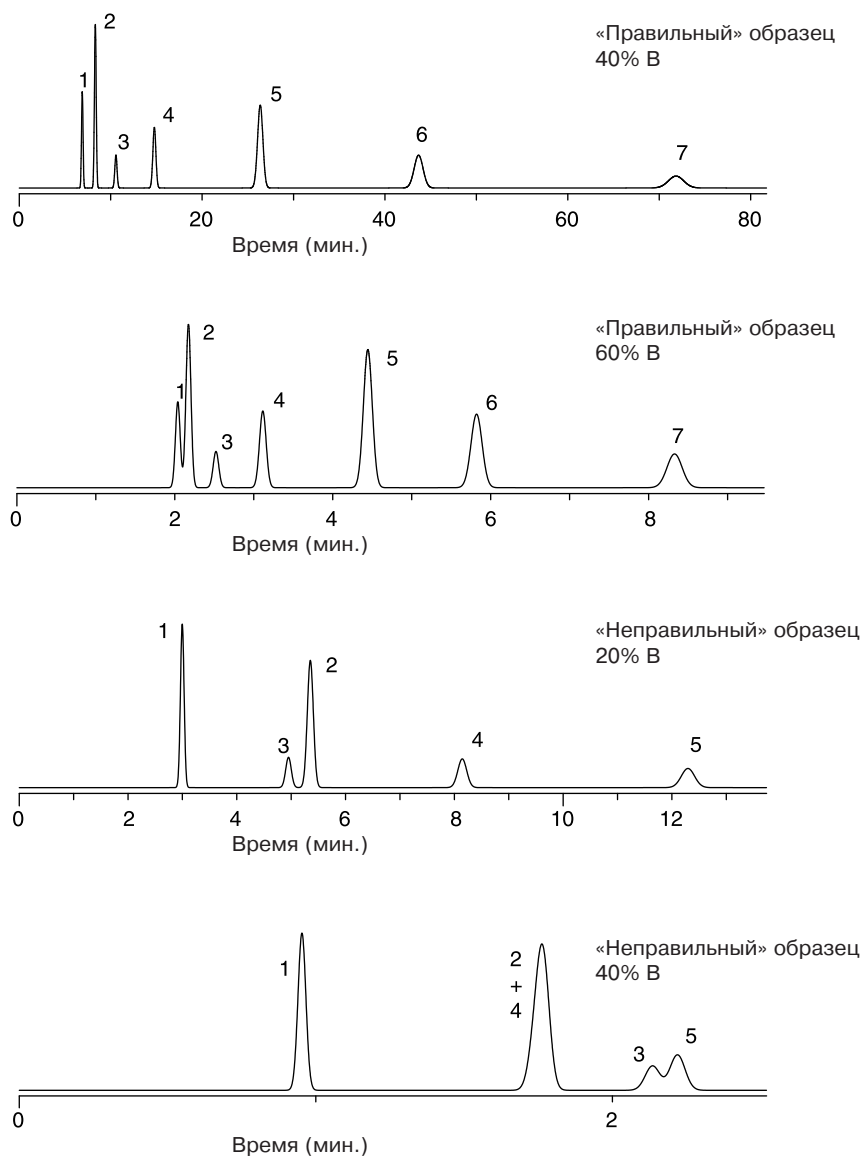


Рис. 1.10. Примеры разделения «правильных» и «неправильных» образцов из табл. 1.3. Условия хроматографии: колонка C_{18} $150 \times 4,6$ мм; 2 мл/мин, другие параметры элюирования представлены в табл. 1.3 или на самом рисунке

моделирования). Большинство образцов сочетают характеристики как «правильных», так и «неправильных» образцов, что выражается в их промежуточном поведении при изменении %В в изократическом элюировании или при изменении условий градиента в градиентном элюировании. В результате изменение процента В в изократическом режиме или времени элюции

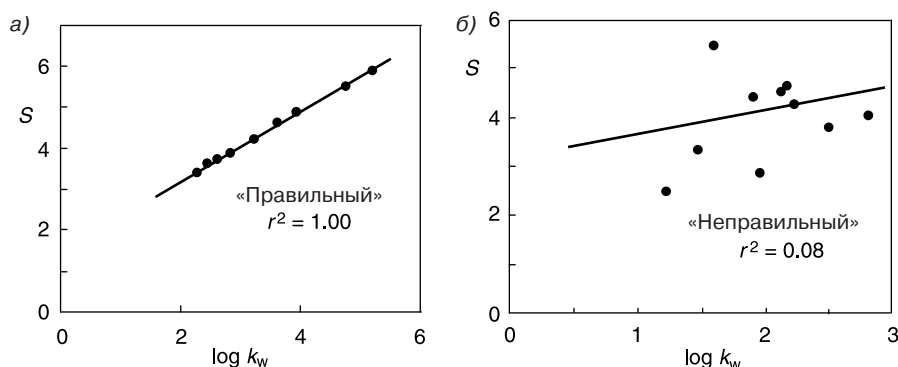


Рис. 1.11. Графики зависимости S от $\log k_w$ для а) «правильных» и б) «неправильных» образцов из табл. 1.3

в градиентном часто приводят к потенциально полезным изменениям в последовательности элюирования компонентов или селективности разделения.

Литература

1. R. L. M. Syngé, *Discussions Faraday Soc.* 7 (1949) 164.
2. L. S. Ettre, *LCGC* 21 (2003) 458.
3. L. R. Snyder, *Chromatogr. Rev.* 7 (1965) 1.
4. J. W. Dolan and L. R. Snyder, *LCGC* 17 (1999) S 17 (April supplement).
5. H. Xiao, X. Liang, and P. Lu, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 186.
6. G. A. Howard and A. J. P. Martin, *Biochem. J.* 46 (1950) 532.
7. C. Liteanu and S. Gocan, *Gradient Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1974.
8. P. Lebreton, *Bull. Soc. Chim. France* (1960) 2188.
9. L. E. Ettre, *LCGC* 20 (2002) 128.
10. W. E. Harris and H. W. Habgood, *Programmed Temperature Gas Chromatography*, Wiley, New York, 1967.
11. D. E. Bautz, J. W. Dolan, W. D. Raddatz, and L. R. Snyder, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1560.
12. J. W. Dolan, L. R. Snyder, and D. E. Bautz, *J. Chromatogr.* 541 (1991) 21.
13. R. P. W. Scott and J. G. Lawrence, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 65.
14. L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.* 8 (1970) 692.
15. K. Aitzetmüller, *J. High Resolut. Chromatogr.* 13 (1990) 375.
16. G. Hesse and H. Engelhardt, *J. Chromatogr.* 21 (1966) 228.
17. T. Greibokk and T. Andersen, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 743.
18. P. Schoenmakers, in *Handbook of HPLC*, E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, and N. Miller, eds, Marcel Dekker, New York, 1998, p. 193.
19. P. Jandera, *Adv. Chromatogr.* 43 (2004) 1.
20. T. Braumann, G. Weber, and L. H. Grimme, *J. Chromatogr.* 261 (1983) 329.
21. M. A. Quarry, R. L. Grob, and L. R. Snyder, *Anal. Chem.* 58 (1986) 907.
22. F. Leroy, B. Presle, F. Verillon, and E. Verette, *J. Chromatogr. Sci.* 39 (2001) 487.
23. S. R. Needham and T. Wehr, *LCGC Europe* 14 (2001) 244.
24. J. Ayrton, G. J. Dear, W. J. Leavens, D. N. Mallet, and R. S. Plumb, *J. Chromatogr. B* 709 (1998) 243.

25. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2nd edn, Wiley-Interscience, New York, 1997.
26. K. H. Nelson and D. Schram, *J. Chromatogr. Sci.* 21 (1982) 218.
27. L. Hagdahl, R. J. P. Williams, and A. Tiselius, *Arkiv. Kemi* 4 (1952) 193.
28. J. Aurenge, *J. Chromatogr.* 84 (1973) 285.
29. E. Soczewiński and C. A. Wachtmeister, *J. Chromatogr.* 7 (1962) 311.
30. L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* 13 (1964) 415, 15 (1964) 344.
31. L. R. Snyder and D. L. Saunders, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 195.
32. L. R. Snyder, J. W. Dolan, and J. R. Gant, *J. Chromatogr.* 165 (1979) 3.
33. J. W. Dolan, J. R. Gant, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* 165 (1979) 31.
34. L. R. Snyder and J. W. Dolan, *Adv. Chromatogr.* 38 (1998) p. 115.
35. P. Haber, T. Baczek, R. Kaliszan, L. R. Snyder, J. W. Dolan, and C. T. Wehr, *J. Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 386.
36. T. H. Jupille, J. W. Dolan, L. R. Snyder, W. D. Raddatz, and I. Molnar, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 35.
37. Molnar, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 175.
38. P. L. Zhu, L. R. Snyder, J. W. Dolan, N. M. Djordjevic, D. W. Hill, L. C. Sander, and T. J. Waeghe, *J. Chromatogr. A* 756 (1996) 21.