



М И Р Х И М И И

К.С. Сычев

Практическое руководство по жидкостной хроматографии

Под редакцией А.А. Курганова

ТЕХНОСФЕРА

Москва

2010

Сычев К.С.

Практическое руководство по жидкостной хроматографии

Москва:

Техносфера, 2010. — 272 с., ISBN 978-5-94836-238-0

Книга написана как практическое руководство, основная задача которого состоит в поэтапном тренинге начинающего специалиста как в области конкретно жидкостной хроматографии, так и в областях аналитической и физической химии в целом. Автор надеется, что руководство поможет специалисту с любым уровнем подготовки пройти путь до квалифицированного аналитика и исследователя, способного разрабатывать методики самой высокой сложности.

© 2010, К.С. Сычев.

© 2010, ЗАО «РИЦ «Техносфера», оригинал-макет, оформление.

ISBN 978-5-94836-238-0

Содержание

Предисловие автора	11
Предисловие научного редактора	13
Отзывы	14
Глава 1. Что такое хроматография?	19
1.1. Физико-химический анализ. Адсорбция. Твердофазная экстракция и хроматография. Проведение хроматографического определения	19
1.2. Жидкостная хроматография низкого и высокого давления. Схема жидкостного хроматографа высокого давления	24
1.3. Как улучшить разделение?	28
1.3.1. Удерживание. Разрешение	29
1.3.2. Селективность – параметр, отражающий физико-химические взаимодействия в хроматографической системе	31
1.3.3. Эффективность хроматографической колонки. Пиковая плотность. Асимметрия пика	33
1.3.4. Связь разрешения с селективностью, эффективностью и фактором удерживания (основная формула хроматографии)	35
Глава 2. Начинаем работать на жидкостном хроматографе	38
2.1. Как управлять временем удерживания?	39
2.1.1. Полярность. Полярные и неполярные растворители и адсорбенты	39
2.1.2. Как происходит удерживание. Что значит «нормальная фаза» и «обращенная фаза»? Элюирующая сила растворителя. Применение для элюирования смесей растворителей различной полярности. Компоненты элюента: основа, добавка и модификатор	42
2.1.3. Зависимость удерживания от состава элюента. Уравнение Скотта	48
2.1.4. Удерживание ионных соединений на обращенной фазе. Модификатор в обращенно-фазовых системах. Универсальные ОФ системы. Примеры универсальных систем	50
2.2. Принципы работы основных узлов хроматографа	56
2.2.1. Насос плунжерного типа. Изократическое и градиентное элюирование. Градиентные системы смешивания при высоком и низком давлении	56
2.2.2. Инжектор	61

2.2.3. Фотометрический и флуориметрический детекторы. Поглощение УФ излучения растворителями. Другие детекторы для ВЭЖХ	62
2.2.4. Соединение блоков в единую жидкостную систему	69
2.3. Общие рекомендации к проведению хроматографического анализа. Рабочее место. Приготовление элюента. Заполнение насосной системы элюентом. Замена одного элюента на другой, смешивающийся или несмешивающийся с предыдущим. Фильтрация пробы. Применение ин-лайн фильтров и предколонок. Промывка узлов хроматографа	70
2.4. Изократическое и градиентное элюирование. Применение ресикла элюента при изократическом элюировании. Техника градиентного элюирования, «вогнутые» и «выпуклые» профили градиента. Общие рекомендации к проведению градиентного элюирования	73
2.5. Выбор растворителя для приготовления пробы	81
Глава 3. Обработка хроматографических данных	84
3.1. Базовая линия. Высоочастотные и низкочастотные шумы. Сжатие и сглаживание хроматограммы. Отношение сигнал/шум. Предел детектирования (LOD) и предел определения (LLOQ). Дрейф базовой линии	84
3.2. Разметка хроматограммы	89
3.3. Основы качественного анализа. Способы идентификации соединений. Арбитражный метод. Ложноположительный и ложноотрицательный результаты идентификации	92
3.4. Основы количественного анализа	102
3.4.1. Градуировка. Метод внешнего стандарта. Метод внутреннего стандарта, его преимущества и ограничения	102
3.4.2. Погрешность измерения. Случайная и систематическая погрешности. Термины по ГОСТ ИСО 5725: точность (accuracy), правильность (trueness), прецизионность (precision), повторяемость (repeatability), воспроизводимость (reproducibility). Вычисление доверительного интервала. Источники случайной погрешности. Вклад влияния шума детектора в общую погрешность измерения. Источники систематической погрешности. Что такое «неопределенность измерения»?	107
3.4.3. Одноточечная градуировка	111
3.4.4. Многоточечная градуировка. Применение линейной и нелинейной регрессии; критерии приемлемости аппроксимации	114
3.4.5. Полуколичественные измерения	118

3.4.6. Контроль коэффициентов извлечения при помощи метода внутреннего стандарта. Применение стандартов-суррогатов (surrogate standard) и стандартов выхода (recovery standard)	119
3.4.7. Валидация хроматографических методик	121
Глава 4. Оптимизация хроматографического определения	123
4.1. Основы теории процесса разделения в ВЭЖХ	123
4.1.1. Теория скоростей и уравнение Ван-Деемтера. Кинетика массопередачи в хроматографической системе. Зависимость Энделя и Халаша	123
4.1.2. Уравнение Дарси	127
4.2. Регулирование основных параметров хроматографического анализа	128
4.2.1. Способы увеличения эффективности разделения	128
4.2.2. Способы сокращения времени анализа	132
4.2.3. Способы повышения чувствительности анализа (уменьшения предела определения целевых соединений)	134
4.3. Алгоритмы оптимизации хроматографического разделения ...	137
Глава 5. Виды жидкостной хроматографии. Управление селективностью разделения. Неподвижные фазы для ВЭЖХ	142
5.1. Неподвижные фазы (НФ) для жидкостной хроматографии	142
5.1.1. Архитектура (физическая структура) современных неподвижных фаз (НФ) для жидкостной хроматографии	142
5.1.2. Особенности строения современных обращенно-фазовых НФ на основе силикагеля. Способы улучшения химической инертности, гидролитической стабильности, устойчивости к фазовому коллапсу. Высокий и низкий ценовые сегменты для обращенных фаз. Тестирование неподвижных фаз, тестовые смеси для обращенно-фазовых НФ. Крэш-тесты	144
5.1.3. Перспективные направления синтеза новых НФ. Фазы, устойчивые в широком диапазоне pH. Фазы с ограниченно доступной поверхностью. Фазы для высокотемпературной хроматографии	151
5.2. Обращенно-фазовая хроматография (ОФ ВЭЖХ), ее преимущества и закономерности. Модель удерживания в ОФ ВЭЖХ	153
5.3. Нормально-фазовая хроматография (НФ ВЭЖХ) и ее основные закономерности. «Диполь-полевая» модель удерживания в НФ ВЭЖХ. Неподвижные фазы для НФ ВЭЖХ	160
5.4. Гидрофильная хроматография (HILIC). ДИРФ режим	171

5.5. Ионная хроматография	176
5.6. Хроматография с переносом заряда	180
5.7. Эксклюзионная хроматография	185
5.8. Ион-парные режимы хроматографии. Мицеллярная хроматография	192
Приложение А. Метод жидкостной хроматографии как объект исследования	198
А.1. Вводный курс лекций по общей химии	198
А.1.1. Модель как способ познания мира	198
А.1.2. Модель химии как науки	200
А.1.3. Понятие о веществе. Силы, приводящие к образованию макротел	202
А.2. Физико-химические взаимодействия в хроматографической системе	205
А.2.1. Дипольные взаимодействия	208
А.2.2. Водородная связь	210
А.2.3. Модель выталкивания из структурированной среды	213
А.2.4. Ионные взаимодействия	213
А.2.5. Дисперсионные взаимодействия	214
А.2.6. Взаимодействия с переносом заряда (π -взаимодействия)	215
А.2.7. Координационные взаимодействия	216
А.3. Типы удерживания в жидкостной хроматографии	216
А.3.1. Логическая связь между типом удерживания и видом хроматографии	219
А.3.2. Расчет количественных характеристик типов удерживания (дескрипторов удерживания) при помощи метода факторного анализа	222
Приложение Б. Хиральная высокоэффективная жидкостная хроматография	226
Б.1. Основные типы хиральных неподвижных фаз	226
Б.2. Закономерности хиральной ВЭЖХ	231
Приложение В. Список международных сокращений, принятых в хроматографии	238
Высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия компании Waters	243
Возможности хромато-масс-спектрометров корпорации Termo Fisher Scientific	248
LaChrom Elite – решение Hitachi High Technologies для высокоэффективной жидкостной хроматографии	262
Жидкостные хроматографы «Стайер»: этапы создания и современный взгляд	267

Предисловие автора



Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является эффективным методом аналитического контроля и экспертизы. В частности, этот инструментальный метод химического анализа широко применяется в таких контролирурующих организациях, как:

- службы санитарно-эпидемиологического контроля, профильные лаборатории контроля безопасности и выявления фальсификаций пищевых продуктов;
- службы контроля безопасности и выявления фальсификаций лекарственных препаратов;
- службы контроля за распространением наркотиков, наркологические диспансеры, службы криминалистической и судебно-медицинской экспертизы;
- водоканалы, службы экологического контроля предприятий и профильные экологические контролирующие организации.

Для применения ВЭЖХ в промышленности сложно выделить какие-либо конкретные ниши; метод может с успехом использоваться везде, где имеют дело с органическими материалами и веществами. Он применим для контроля качества готовой продукции или закупаемого сырья, для проведения исследований, разработок новых видов продукции или новых технологических схем. Кроме того, препаративная жидкостная хроматография сама по себе может являться средством производства — прежде всего, в фармацевтической индустрии.

Таким образом, хроматографию можно по праву считать обособленной научно-технической отраслью, возникшей на тесном стыке науки, техники и прикладных разработок.

Как и любая наукоемкая отрасль в России, хроматография значительно пострадала в течение «смутного времени» девяностых, однако в настоящее время она достаточно уверенными темпами возрождается. Основными факторами роста являются развитие промышленного производства и курс государства на повышение уровня безопасности жизнедеятельности населения.

Определенный парадокс заключается в том, что основным препятствием в развитии хроматографии сейчас является не столько нехватка оборудования или средств на его приобретение, сколько острая нехватка квалифицированного персонала. Причем, она имеет не только количественный, но и выраженный качественный характер: для внедрения хроматографии в промышленности недостаточно просто обслуживать

приборы — необходимо разрабатывать новые аналитические методики с применением этих приборов. Разработка же методик требует от специалистов ряда очень специфических знаний, которые невозможно (то есть в России сейчас невозможно) получить принципиально нигде. Не хватает в нашей стране и книг по хроматографии.

Данное практическое руководство создано для того, чтобы как-то восполнить этот пробел: помочь начинающим специалистам в освоении хроматографической техники, а специалистам более опытным — посодействовать в разработке аналитических методик. Несколько необычным может показаться читателю стиль книги, максимально приближенный к диалогу (например, разговору друзей по лаборатории). Идея состояла в том, что, в отличие от академического стиля, при такой подаче материала знания станут значительно легче применять на практике. Задача-максимум состояла в том, чтобы практическое руководство позволяло не просто получать знания, а тренировать навыки работы. Надеюсь, что задача, пусть и неполностью, но выполнена — по мере наших сил и возможностей.

«Наших», поскольку в создании практического руководства сумел — явно или неявно, в большей или меньшей степени — отметиться целый коллектив авторов. Проект был задуман еще в 2003 году и в шутку назывался «СССР», по первым буквам фамилий авторов: Сапрыкин, Сычев, Сычев и Рудаков. Исторически, проект распался на четыре самостоятельных части; книги Леонида Викторовича Сапрыкина, Сергея Николаевича Сычева и Олега Борисовича Рудакова уже вышли в печать (надеюсь, читатель с ними знаком). Таким образом, данное практическое руководство является четвертой книгой проекта и символически его завершает, давая путь новым идеям и новым проектам.

Часть А.1 Приложения А руководства, посвященная общим принципам моделирования в науке и в химии в частности, была написана на основе лекций Сергея Николаевича Сычева по общей химии, читаемых студентам нехимических специальностей. Автору показалось, что без такой полезной частички прикладной философии книге не обойтись.

Огромную благодарность хочу выразить Александру Александровичу Курганову, который профессионально, очень быстро и в удобном для автора формате произвел научное редактирование книги. Много ценных замечаний по 3-й главе сделала Алена Юрьевна Михеева; некоторые моменты из 3-й главы прокомментировал Юрий Анатольевич Каламбет — им тоже огромное спасибо! Во 2-й главе часть справочных материалов взята из книги Олега Борисовича Рудакова, а в 5-й главе большая доля материалов по жидкость-жидкостной хроматографии (ДИРФ-режим) взята из книги Леонида Викторовича Сапрыкина.

Спасибо всем, кто болел за эту книгу! И отдельная благодарность рекламодателям, без поддержки которых она не смогла бы выйти в свет. Удачи!

Сычев Константин Сергеевич,
к.х.н., индивидуальный предприниматель

Предисловие научного редактора



В современной аналитической химии ведущее положение занимают инструментальные методы анализа, поскольку они в полной мере отвечают все возрастающим требованиям со стороны науки и практики к точности, экспрессности и универсальности проведения анализов. Хроматография, в ряду методов инструментального анализа, является наиболее мощным методом разделения и анализа сложных смесей соединений, и она широко использует другие инструментальные методы, например, спектрометрию или электрохимию, для качественной и количественной оценки результатов хроматографического разделения.

Среди различных вариантов хроматографического анализа очень широкое применение в последние десятилетия получила жидкостная хроматография, в первую очередь благодаря возможности анализа сложных смесей биообъектов, таких как белки, нуклеиновые кислоты, антиоксиданты, фармпрепараты и т.д.

Предлагаемая книга позиционируется ее автором как практическое руководство к проведению жидкостного хроматографического анализа. Автор книги давно и успешно работает в области жидкостной хроматографии, и приводимый в книге материал основан, прежде всего, на его личном опыте. Несомненно, книга представит интерес как для тех, кто только еще собирается вступить на путь применения хроматографического анализа, так и для тех, кто уже давно и хорошо знаком с этим методом.

Читатели первой группы найдут в книге подробное объяснение устройства жидкостного хроматографа и общую методику проведения хроматографического разделения. Здесь отмечены наиболее часто встречающиеся ошибки и пути по их устранению. Читателям второй группы будут интересны общетеоретические вопросы и вопросы номенклатуры и определений в жидкостной хроматографии. Представляется, что эта часть книги вызовет определенную дискуссию в кругах хроматографистов, которая послужит делу дальнейшего углубления и расширения наших представлений о хроматографической науке.

*Курганов Александр Александрович,
д.х.н., зав. лабораторией хроматографии ИИХС РАН, г. Москва*

Отзывы



Михеева Алена Юрьевна,
*к.х.н., ведущий специалист Центра исследования
и контроля воды (ЦИКВ), г. Санкт-Петербург*

Книга написана простым и понятным языком, и это выгодно отличает ее от множества других изданий, посвященных хроматографии. Все сложные вопросы изложены четко и ясно. Кроме того, дано множество ценных практических рекомендаций.



Харлампович Татьяна Анатольевна,
*начальник исследовательской
лаборатории ЗАО «Эвалар», г. Бийск*

Оригинально, ново, доступно! И, главное, с учетом современных тенденций в развитии хроматографии. В книге очень хорошо выдержан принцип «от простого к сложному», освещены часто встречающиеся хроматографические трудности и предложены практические советы по их преодолению.

В наше время, когда жидкостная хроматография становится более доступной и востребованной, книга может стать хорошим советчиком и попутчиком как для начинающих хроматографистов, так и для специалистов со стажем. С удовольствием будем изучать и использовать в работе почерпнутые знания.



Рудаков Олег Борисович,
*д.х.н., профессор, зав. кафедрой химии ВГАСУ,
г. Воронеж*

После первой отечественной книги «Хроматография», в которой замечательный советский ученый Константин Чмутов популярно рассказал об этой группе гибридных методов разделения-анализа, прошло более тридцати лет. За это время хроматографические методы заняли лидирующее место в инструментальном анализе веществ, особенно методы жидкостной хроматографии. Вместе с тем в

России книг, руководств и пособий по приемам работы на современных жидкостных хроматографах практически нет, а те, что появлялись, выходили мизерными тиражами, сразу превращаясь в раритет.

Обычно учебные пособия пишутся в псевдоакадемическом стиле, где за строгими дефинициями следует скучное описание поднимаемой темы. Книга К. Сычева, по моему мнению, — одна из немногих удачных попыток доходчиво, буквально на пальцах, с яркими примерами, часто в форме диалога с читателем, рассказать о жидкостной хроматографии, об азах и секретах практической работы на сложном хроматографическом оборудовании. К. Сычев приводит в своей книге большое количество полезных рекомендаций, он снабдил ее необходимым минимумом справочных данных, вместе с тем не перегружая ими книгу.

Наряду с присущим нынешнему поколению хроматографистов прагматизмом автор подходит к подаче материала креативно, порой используя для интерпретации результатов хроматографического разделения свежие, но еще не общепризнанные теоретические представления о механизмах удерживания в тех или иных хроматографических системах. К. Сычев, будучи учеником такого специалиста с мировым именем в области жидкостной хроматографии, как Вадим Даванков, перенял от него смелость и философичность суждений. Другим его учителем является отец — Сергей Сычев, профессор Орловского технического университета, один из разработчиков микроколоночной хроматографической системы «Милихром», от которого он унаследовал полемичность и желание докопаться до физических первопричин сорбционных процессов. Следует отметить еще одного самобытного ученого с энциклопедическими знаниями, краснодарского хроматографиста Леонида Сапрыкина, который, безусловно, повлиял на творчество К. Сычева. В постоянных дискуссиях между ними на форуме www.anchem.ru родилась не одна интересная идея.

Таким образом, книга может быть рекомендована не только начинающим, но и профессиональным хроматографистам, она особенно полезна студентам, магистрантам и аспирантам, изучающим инструментальные методы контроля качества и безопасности пищевой, бытовой и фармацевтической продукции.



Ризванов Ильдар Хамидович,

к.х.н., зав. лабораторией физико-химического анализа ИОФХ КНЦ РАН, г. Казань

С большим интересом прочел главы давно ожидаемой книги по практической жидкостной хроматографии. Как я понимаю, публикация уже не за горами, с чем я и хочу поздравить автора.

Впечатления у меня в целом положительные. Хроматографические методы анализа по своей распространенности, доступности и информативности не имеют себе равных, приборная база постоянно совершенствуется, поэтому потребность в современных пособиях еще не скоро пропадет. И появление такой книги лишним, конечно же, не будет.

В последнее время я стал довольно часто использовать ОФ ВЭЖХ для отделения интересных меня соединений с целью их последующего анализа методом МС. Методика эта, к счастью, далеко не нова, относительно проста в исполнении, поэтому дает хорошие результаты и существенно облегчает проведение анализов.

Здесь лично для меня подобная книга представляет большой интерес, поскольку раскрывает аналитические подходы для разделения смесей разных типов, которые, думаю, будут мной использованы. Приведенные в книге практические примеры и пояснения к ним довольно удачно вписываются по ходу текста, поэтому легко воспринимаются.

Если говорить о замечаниях, то их у меня много и касаются они главным образом применения разговорных выражений. Высказывать сейчас я их не буду – хотелось бы увидеть вариант, согласованный с рецензентами. Желаю автору дальнейших успехов!



Федоров Евгений Константинович,
*PhD, Senior Director, Research and Development
WARNEX Bioanalytical Services, Laval, QC, Canada*

В целом, впечатление от книги у меня положительное. Для начинающего хроматографиста, не знакомого с методом и прибором, книга будет ценным пособием, позволяющим самостоятельно научиться практическим основам высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В то же время, она дает достаточно глубокую проработку физико-химических основ метода во всех его вариантах, что должно помочь читателю и в вопросах разработки и оптимизации трудных разделений. Книга побуждает читателя к более глубокому изучению всех вопросов по научным публикациям.

Таким образом, практическое пособие будет полезно не только для начинающих хроматографистов, желающих быстро и самостоятельно овладеть методом, но и для более опытных химиков-аналитиков, желающих расширить свой кругозор.



Сычев Сергей Николаевич,
д.т.н., профессор кафедры «Химия» ОГТУ

Книгу прочитал с большим интересом, тем более, что написал ее мой сын, к работе которого я отношусь весьма критично. При первом прочтении бросилось в глаза использование не совсем, казалось бы, корректной терминологии. Попробовал переписать некорректности сам: получи-

лось, что к каждому «корректному» термину нужно еще писать пояснения в объеме 10–15 страниц текста. Когда объем комментариев начал приближаться к 150 страницам убойного научного текста – понял, что Константин прав. К счастью, не успел наговорить резкостей. С удовольствием дочитал книгу до конца и оценил труд и настойчивость автора.

Книгу надо публиковать, потому что получается интересная работа, в ряде случаев не только помогающая начинающим специалистам, но и заставляющая иногда «попыхтеть» и полемистов от хроматографии и межмолекулярных взаимодействий.



Сапрыкин Леонид Викторович,

к.х.н., зав. лабораторией физико-химических методов анализа ОАО «НИПИгазпереработка», г. Краснодар

Вот мы, наконец, дождались компиляции богатого хроматографического опыта Константина Сычева в виде самобытной и, несомненно, полезной книги.

Сразу обращает на себя внимание далекий от академического стиль изложения, больше напоминающий кулуарную беседу автора с читателем. Мне это чем-то напомнило книги Е. Айсберга, известного популяризатора науки и техники.

Автор безуспешно попытался на простых примерах и аналогиях донести до читателя достаточно сложные понятия из теории и практики ВЭЖХ. Это же делает книгу несколько эклектичной, поскольку в ней соседствуют как максимально упрощенные понятия и рассуждения, так и логические выкладки, доступные для понимания лишь достаточно опытному специалисту. Прослеживается стремление охватить и осветить все мыслимые аспекты теории и практики ВЭЖХ. Где-то это удастся лучше, где-то не вполне удачно. Иногда не хватает строгости и структурированности поданной информации.

Тем не менее, книга является ценным пособием как для начинающих хроматографистов, так и для опытных пользователей этого универсального метода разделения и анализа веществ. Мне сложно даже выделить целевую аудиторию этого труда, но то, что она будет достаточно широка, сомневаться не приходится.

В книге очень много информации практического плана, которая обязательно будет востребована широким кругом аналитиков и поможет им сохранить свое время, нервы и ресурс хроматографического оборудования.



Семенов Сергей Юрьевич,
*к.ф.-м.н., директор Российского НИИ
чрезвычайных ситуаций ФМБА России, г. Москва*

Как сказано в аннотации к монографии, «задача состояла в том, чтобы написать «настольное» руководство по практической работе, одинаково полезное для специалистов различного уровня подготовки — от достаточно хорошего до самого начинающего».

С поставленной задачей автор справился вполне, и в книге удалось осветить все необходимые сведения о методе хроматографии, принципах работы элементов хроматографа, дать рекомендации к проведению хроматографического анализа и сообщить важнейшие справочные данные по всем ключевым вопросам жидкостной хроматографии. Изложенный в книге материал легко воспринимается и читается с большим интересом. Большое количество иллюстраций очень помогает читателю в понимании излагаемого материала. Специальные термины русского и англоязычного происхождения всегда сопровождаются необходимыми определениями и комментариями.

Наиболее интересной для меня в монографии является глава «Виды жидкостной хроматографии. Управление селективностью разделения. Неподвижные фазы для ВЭЖХ». Здесь наряду с разбором особенностей различных модификаций метода жидкостной хроматографии присутствует богатый экспериментальный материал, снабженный большим числом иллюстраций. Многие специалисты, применяющие метод жидкостной хроматографии для идентификации веществ разнообразной природы, найдут в этом разделе для себя много полезного и важного.

ГЛАВА 1

ЧТО ТАКОЕ ХРОМАТОГРАФИЯ?

Это первая глава книги, которая доступно отвечает на вопросы «Что такое физико-химический анализ?» и «Что такое хроматография?»

Сложные термины я старался вводить постепенно, по ходу текста, каждый раз комментируя их значение. Отмечу, что не только все термины, но и просто слова из специфического лексикона при первом их появлении в тексте выделялись курсивом. Так, выделения удостоились не только существительное «адсорбция» (это термин), но и глагол «переносить». Это потому, что вещество в стакан не засыпается, насыпается или кладется, а «навеска вещества переносится в стакан». И привыкать к этому лучше сразу — переучиваться сложнее. Некоторые важные термины будут сразу даваться на русском и английском языках.

1.1. Физико-химический анализ. Адсорбция. Твердофазная экстракция и хроматография. Проведение хроматографического определения

Начнем с «физико-химического анализа». Ключевое слово здесь — «анализ», что в переводе с греческого обозначает «разделение». Другими словами, анализ проводится с целью что-то разобрать и выяснить, что из чего состоит. Нас интересует конкретно анализ вещества, причем вещество может быть каким угодно. К примеру, сладким чаем. Здесь сладкий чай — это *объект* анализа.

Вот, допустим, на столе стоит стакан с жидкостью (я знаю, что там напиток, но вам пока не скажу). На стакане написано «№ 043». Это *образец* номер 043, или *проба* номер 043 (на английском оба термина обозначаются словом *sample*). Посмотрим на жидкость. Она коричневая (это свойство «заварки»). На запах — пахнет чаем (свойство «заварки»). Возьмем стакан и немного взболтаем жидкость. По плотности и вязкости можно предположить, что основа жидкости — вода. Попробуем жидкость на вкус и окончательно убедимся, что основа жидкости — действительно вода.

МС-АНАЛИТИКА

TEXTRONICA AG

www.textronica.com

+7 (495) 995 88 90

+7 (495) 937 96 33

Также мы почувствуем, что жидкость сладкая (свойство сахара) и имеет вкус чая (свойство «заварки»). Вывод: в стакан налит сладкий чай.

Только что мы провели простейший анализ вещества, а именно: образца объекта «сладкий чай» с номером 043. В результате анализа мы поняли, что оно собой представляет, то есть мы *идентифицировали* объект. Это удалось сделать благодаря тому, что мы изучали его физические и химические свойства. Поэтому этот анализ с полным правом можно назвать физико-химическим. По отдельным свойствам мы сначала догадались, какие именно составляющие компоненты присутствуют в жидкости. А уже по списку составляющих компонентов догадались (*сделали заключение*) о том, что есть эта жидкость.

В этом случае, однако, мы не разделяли компоненты фактически. Мы всего лишь замечали индивидуальные свойства компонентов, наблюдая за их смесью. Но можно все сделать иначе. К примеру, методами перегонки, экстракции и осаждения действительно разделить сладкий чай на составляющие его воду, сахар и «заварку». Это будет гораздо сложнее, но зато надежнее и информативнее. Мы будем иметь не косвенные, а прямые доказательства своей правоты — выделенные в чистом виде компоненты, которые раньше находились в смеси.

По такому принципу, в частности, работает и хроматографический метод. В этом физико-химическом методе вещество также разделяется на составляющие компоненты, но не за счет перегонки, экстракции или осаждения. Хроматография основана на явлении распределения вещества между двумя несмешивающимися фазами. В том случае, когда одна из фаз является твердым веществом, процесс распределения называют *адсорбцией* (adsorption).

Адсорбция — это процесс преимущественного концентрирования вещества твердой фазой, которую в этом случае называют *адсорбентом* (adsorbent). Разные химические вещества концентрируются адсорбентами в разной степени, что и положено в основу их разделения.

Для иллюстрации адсорбции можно провести очень простой опыт. Для этого всего лишь нужно пропустить крепкий сладкий чай через любой бытовой фильтр для очистки воды со свежей кассетой. Раствор, прошедший через фильтр, (фильтрат), будет почти бесцветным, но не менее сладким, чем исходный чай. Все дело в том, что кассета бытового фильтра заполнена смесью двух адсорбентов: активированного угля и ионообменного пористого полимера. Они достаточно эффективно адсорбируют из воды пигменты (красители) чая, а вот удалить из воды сахар им не по силам. Так что условно можно считать, что нам удалось адсорбционно разделить сладкий чай на сладкую воду и «заварку».

Только что мы провели типичный эксперимент по *твердофазной экстракции* (solid-phase extraction), или сокращенно *ТФЭ* (SPE). Как правило, ТФЭ применяется не для анализа непосредственно, а для предварительной *очистки* (sample clean-up) или концентрирования компонентов образца перед анализом, то есть для *подготовки пробы* (sample preparation). Кассета с адсорбентом в случае ТФЭ называется *адсорбционным картриджем* (cartridge).

Но, разумеется, разделить все компоненты смеси таким образом нельзя, поскольку на картридж постоянно подается раствор со смесью веществ. Провести полное разделение становится возможным, если через слой адсорбента с нанесенной смесью веществ пропускать чистый растворитель. Такой вариант адсорбционного разделения представляет собой один из подвидов *хроматографии* (chromatography). В хроматографии кассету с адсорбентом принято называть *хроматографической колонкой* (column), а наполняющий ее адсорбент (packing) *неподвижной фазой* (stationary phase). Чистый растворитель или смесь растворителей, которые пропускаются через колонку, называют *элюентом* или *подвижной фазой* (mobile phase). Сам процесс пропускания элюента через хроматографическую колонку называется *элюированием* (elution).

Чтобы все стало понятно, предлагаю провести небольшой мысленный эксперимент по хроматографическому разделению. К примеру, нам надо полностью разделить смесь трех красителей: зеленого, синего и красного. Разумеется, смесь этих красителей — черного цвета. Пусть у нас будут в распоряжении хроматографическая колонка из стекла (чтобы было можно наблюдать за разделением) с подходящим адсорбентом и подходящая смесь растворителей, то есть элюент.

Аккуратно нанесем часть образца (пробу) в верхнюю часть хроматографической колонки и начнем пропускать через колонку приготовленный элюент (см. рис. 1.1). Если адсорбент не очень мелкий, с зернением не менее 100 микрометров (100 мкм = 0,1 мм), то элюент будет проходить через слой адсорбента просто под собственной тяжестью. Таким образом, мы пока избежим необходимости *насосной системы* (pump).

Мы будем наблюдать как за колонкой, так и за вытекающим из хроматографической колонки фильтратом, который называется *элюатом*. Причем попытаемся сделать наше наблюдение если не количественным, то хотя бы полуколичественным. Используя зрение как *детектор* (detector), мы будем строить график насыщенности цвета капель элюата от времени с момента начала анализа.

Итак, анализ начинается в момент *подачи* элюента (рис. 1.1а). Через некоторое время t_1 (рис. 1.1б) мы наблюдаем следующую картину: проба разделилась в колонке на три *хроматографических зоны* — зеленую, синюю и красную — по числу компонентов в образце. Это значит, что смесь

красителей разделилась полностью. Ближе к началу колонки (то есть в ее верхней части) находится зона зеленого красителя, в середине — зона синего красителя и уже в самом конце колонки — зона красного красителя. Такая картина наблюдается потому, что зеленый краситель адсорбируется сильнее всего (говорят, что он сильнее всего *удерживается* адсорбентом), в результате чего его хроматографическая зона передвигается вдоль колонки с наименьшей скоростью. Красный же краситель слабо удерживается адсорбентом, поэтому он выходит из колонки (*элюируется*) первым.

Факт элюирования красного красителя с колонки следует надлежащим образом зафиксировать на графике. Сначала мы увидим, что цвет первых капель очень слабый. Он будет нарастать, и в какой-то момент насыщенность цвета будет максимальной. Затем цвет капель опять пойдет на убыль. В результате, сигнал от красного компонента образца на графике будет иметь форму колокола. Такой сигнал называется *пиком* (peak). Время, соответствующее максимуму пика красного красителя, будет называться *временем удерживания* (retention time) красного красителя.

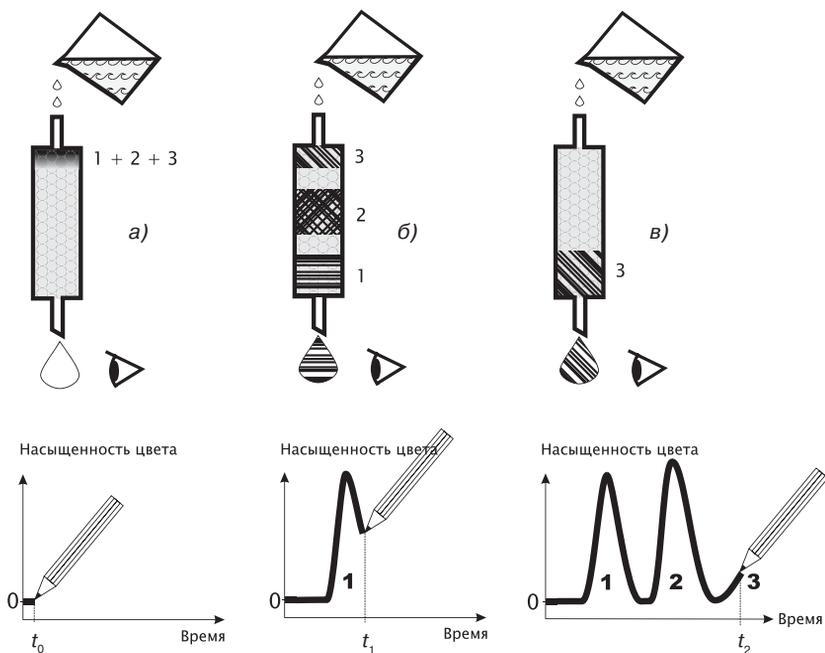


Рис. 1.1. Хроматографическое разделение смеси трех красителей

К некоторому моменту времени t_2 (см. рис. 1.16) красный и синий красители уже вышли из колонки, а зеленый только начинает выходить. На графике, соответственно, видны два пика – и третий только начинает прописываться. График с пиками называется *хроматограммой* (chromatogram). Хроматограмма является основным результатом хроматографического анализа.

Как показывает практика, в большинстве случаев совсем необязательно разделять все компоненты сложной смеси, число которых может достигать сотен и тысяч. Достаточно выделить из исследуемого вещества лишь интересующие нас компоненты. Такие компоненты называют *аналитами* (analysts), или *целевыми соединениями*, а сам анализ конкретных компонентов – *определением*. Допустим, в приведенном выше примере нас интересовало определение только зеленого красителя. Тогда было бы совершенно неважно, отделился ли красный краситель от синего – главное, чтобы пик зеленого красителя хорошо отделился от всех остальных. Таким образом, все компоненты, которые элюируются рядом с целевыми соединениями и могут помешать правильному определению, называются *мешающими соединениями* (contaminants). Если в образце присутствует множество мешающих соединений, то либо от них надо избавляться на стадии очистки пробы, либо подбирать такие условия разделения и детектирования, чтобы гарантировать правильность выполнения определения.

Определение может быть качественным и количественным. Результаты *качественного определения* (identification) отвечают на вопрос: «Есть ли целевое соединение в образце или нет?» (на нижнем пределе детектирования для данного метода анализа). Для хроматографии этот вопрос можно перефразировать так: «Есть ли пик целевого соединения на хроматограмме или нет?»

Результаты *количественного определения* (quantification) отвечают на вопрос: «Какое количество целевого соединения находится в данном количестве образца?» (другими словами: «Какова концентрация целевого соединения в образце?»). В хроматографии концентрация вещества в пробе тем больше, чем больше площадь, ограниченная пиком этого вещества на хроматограмме. Другими словами, концентрация вещества в пробе пропорциональна *площади пика* (peak area) этого вещества.

Вообще, время удерживания и площадь пика являются одними из основных параметров пика. По времени удерживания соединения в выбранных условиях проводят идентификацию этого соединения, то есть качественный анализ. Когда соединение идентифицировано, знание площади пика необходимо уже для количественного анализа.

Кроме того, в зависимости от типа применяемого детектора у пика могут быть индивидуальные *спектральные характеристики*, которые значительно облегчают идентификацию соединений и делают ее значитель-

но более надежной. Опять обратимся к примеру с разделением трех красителей. Допустим, необходимо доказать отсутствие в пробе токсичного красного красителя амаранта, который в выбранных условиях должен элюироваться в начале хроматограммы. Мы видим, что на хроматограмме действительно есть пик красного красителя, причем время удерживания очень похоже на ожидаемое для амаранта. Однако всегда есть вероятность, что это пик не амаранта, а другого, неизвестного красного красителя (а их существуют десятки) с практически совпадающим временем удерживания. Выйти из затруднения можно, применяя в качестве детектора не зрение, а фотометр — прибор, позволяющий измерить для соединения его спектр поглощения, к примеру, в видимой области. Сравнив известный спектр амаранта и полученный спектр неизвестного красного красителя, можно выяснить, действительно ли последний является амарантом или нет.

Все параметры пика: время удерживания, спектральные характеристики, площадь пика — неразрывно связаны с условиями, в которых получена хроматограмма. Их можно формально разделить на условия разделения и условия детектирования. Все условия разделения в совокупности: тип адсорбента, габариты хроматографической колонки, состав элюента, *скорость подачи элюента* (flow rate), температура — называются *хроматографическими параметрами разделения*.

1.2. Жидкостная хроматография низкого и высокого давления.

Схема жидкостного хроматографа высокого давления

Все приведенные до сих пор примеры касались *жидкостной хроматографии* (liquid chromatography, LC), где подвижной фазой является жидкость. Исторически все основные закономерности хроматографии были исследованы именно на примере жидкостной хроматографии. Эту работу провел российский ученый Михаил Семенович Цвет в начале двадцатого века. Однако, серьезное развитие хроматографических методов последовало лишь в середине прошлого века благодаря работам американских и английских ученых в области *газовой хроматографии* (gas chromatography, GC). Подвижной фазой в газовой хроматографии служит инертный газ: азот, гелий или водород.

Первые установки для проведения экспериментов по жидкостной хроматографии были очень простыми. Фактически, они состояли из одной хроматографической колонки. Поскольку в то время были доступны только адсорбенты с достаточно крупными частицами, элюент мог свободно проходить через слой адсорбента под собственной тяжестью. Таким образом, необхо-

димось использование насоса для подачи элюента под значительным давлением отсутствовала. Поскольку первые эксперименты по разделению проводились на образцах смесей натуральных пигментов (красителей), видимых глазом, то в этом случае можно было обойтись без детектора.

Описанные устройства относятся к *хроматографическим системам низкого давления* (low pressure liquid chromatography, LPLC). Разумеется, современные специализированные системы жидкостной хроматографии под низким давлением могут представлять собой сложные и дорогостоящие приборы. Но их объединяет использование адсорбентов с достаточно крупными частицами, в результате чего давление в таких системах не превышает нескольких атмосфер.

Техника проведения эксперимента по разделению при низком давлении достаточно проста. Можно сказать, что она уже была частично описана в предыдущей главе.

Сначала берут специальную стеклянную трубку (вообще говоря, она называется колонкой, как ни странно) длиной около 20 см и диаметром 1–2 см с пористым стеклянным фильтром на дне и сужающимся горлышком (см. рис. 1.2а). Закрепляют ее на штативе в вертикальном положении. Аккуратно переносят в колонку 5–8 см адсорбционного материала — пористого порошка с зернением (средним диаметром частиц) порядка 100 микрон, то есть 0,1 мм. Колонка готова.

Обычно на такую колонку пробу не наносят в жидком состоянии — поступают несколько иначе. Жидкую пробу смешивают с адсорбентом и с минимальным нагреванием отгоняют растворитель. Высушенный адсорбент с нанесенной пробой переносят в колонку и тонким слоем (0,1–0,5 см) распределяют поверх слоя адсорбента. Смешиванием растворителей готовят необходимый объем элюента. И, наконец, проводят элюирование, время от времени добавляя элюент через верхнюю открытую часть колонки. *Фракции* элюата отбирают в пронумерованные градуированные стаканчики или колбы. Хроматограмму можно построить, измеряя какое-либо свойство каждой из фракций: поглощение света в видимом или ультрафиолетовом (УФ) диапазоне, показатель преломления света, электропроводность (если разделяется смесь ионных соединений), активность (если разделяется смесь ферментов), радиоактивность (если разделяются меченные радиоактивными изотопами соединения) и т.д. Все перечисленные методы относятся к *методам детектирования*. Величина измеряемого свойства откладывается по оси *y*, номер фракции — по оси *x*.

Системы низкого давления позволяют работать с большими объемами адсорбента, что является необходимым условием для хроматографического выделения больших количеств целевых веществ высокой чистоты. Хроматография, целью которой является не анализ, а выделение чистых

веществ из содержащих их субстанций, называется *препаративной хроматографией* (preparative chromatography). Колонки для промышленных установок препаративной хроматографии могут достигать 0,5–3 м (!) в диаметре и длины в несколько метров.

Но для целей аналитической химии хроматография низкого давления непригодна. У нее есть существенный недостаток: сравнительно низкая разрешающая способность. Это значит, что хроматографические зоны компонентов получаются очень широкими, и для полного разделения компонентов требуется очень большое различие во времени удерживания. Что на практике, вообще говоря, встречается совсем нечасто. Пример разделения, типичного для хроматографии низкого давления, приведен на рис. 1.2в. Очевидно, что в этом варианте сложно достичь очень хорошего разделения. Кроме того, для элюирования компонентов требуется довольно значительное время.

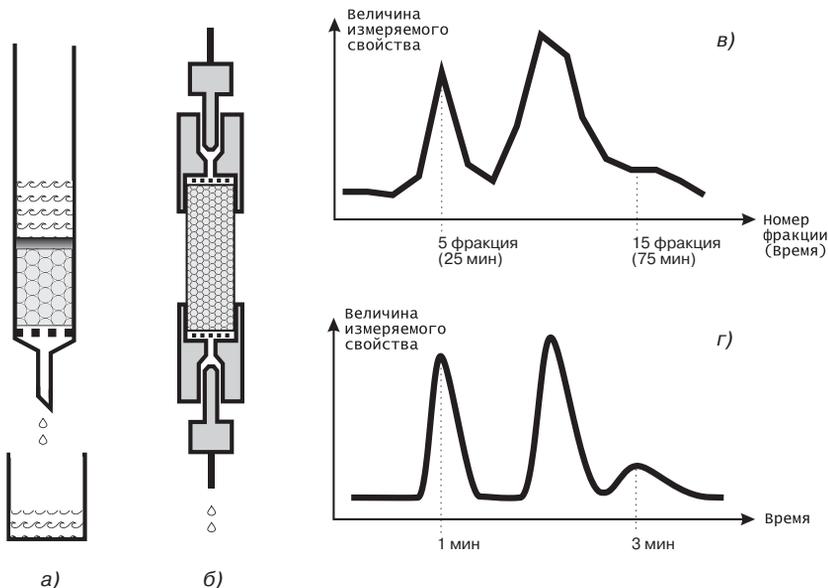


Рис. 1.2. Колонки для хроматографии низкого и высокого давления, а также вид типичных хроматограмм, получаемых на подобных установках: *а* – колонка для разделения при низком давлении, *б* – колонка для разделения при высоком давлении, *в* – типичная хроматограмма разделения трехкомпонентной смеси при низком давлении, *г* – типичная хроматограмма разделения трехкомпонентной смеси при высоком давлении

Причина невысокой разрешающей способности – применение адсорбентов с крупными частицами. Для того, чтобы жидкостная хроматография могла выполнять задачи аналитической химии, необходимо уменьшить средний диаметр частиц адсорбента по крайней мере до 10 микрометров, то есть до 0,01 мм. Подобные адсорбционные материалы стали широко доступны только в начале 70-х годов прошлого века. Переход на новые мелкозернистые адсорбенты повлек за собой революционные изменения в технике для проведения разделений методом жидкостной хроматографии.

Для того, чтобы жидкость (элюент) могла пройти через трубку длиной 15–25 см, плотно упакованную мелким порошком со средним размером частиц 3–5 микрометров (то есть колонку для аналитической хроматографии), необходимо создать значительное давление порядка 100–200 атмосфер. Создать такое давление можно лишь при помощи специального и при этом достаточно дорогостоящего *насоса высокого давления*. Жидкостная хроматография высокого давления получила название *высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭЖХ* (high performance liquid chromatography, HPLC). ВЭЖХ широко применяется как один из наиболее универсальных методов физико-химического анализа вещества.

Колонка для ВЭЖХ, заполненная определенным адсорбентом, является, по сути, промышленно выпускаемым изделием. Она представляет собой стальную (как правило) трубку длиной от 5 до 25 см и внутренним диаметром от 2 до 4,6 мм, которая заполнена адсорбентом определенной марки. Колонка симметрична; с каждой стороны на нее устанавливают пористый фильтр из губчатого титана и съемную (как правило) уплотнительную гайку. Циркулирующая жидкость подводится к колонке и отводится от нее по пластиковым капиллярам, которые закрепляются на концах колонки при помощи специальных уплотнительных винтов – фитингов (см. рис. 1.2б). Типичная для ВЭЖХ хроматограмма приведена на рис. 1.2г. На современных аналитических колонках для жидкостной хроматографии можно полностью разделить до двух-трех десятков компонентов за 10–15 мин.

Но за все хорошее, как известно, надо платить: для проведения разделений методом ВЭЖХ одной колонки уже недостаточно – здесь требуется целый прибор, который называется *жидкостным хроматографом* (liquid chromatograph). Схема самого простого варианта жидкостного хроматографа приведена на рис. 1.3. Как мы уже выяснили, для ВЭЖХ нужен насос высокого давления. Кроме того, для ввода (*инжектирования*) пробы под давлением также необходимо специальное устройство, которое называется *инжектором* (injector). Наконец, аналитический прибор не может обойтись без высокочувствительного *детектора* (detector).

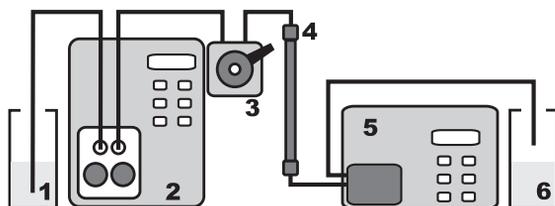


Рис. 1.3. Схема устройства жидкостного хроматографа: 1 – емкость для забора элюента, 2 – насосная система, 3 – система инъекции (ввода пробы), 4 – хроматографическая колонка, 5 – система детектирования, 6 – емкость для слива элюата

Задача детектора состоит в том, чтобы «замечать» самые различные вещества, выходящие из хроматографической колонки, даже в наименьшей концентрации, и количественно отображать сигналы от компонентов разделенной смеси на хроматограмме.

1.3. Как улучшить разделение?

Возможности хроматографии как метода анализа вещества очень сильно зависят от ее способности обеспечивать как можно лучшее разделение сложных смесей на индивидуальные компоненты. От этого зависит правильность анализа или даже вообще возможность проведения определения. И, разумеется, совсем немаловажно время анализа – никому не нужен метод, требующий часы на простейшее определение. Одним словом, каждый хроматографист мечтает (но только в рабочее время) как бы разделить свои образцы получше и поскорее. Процесс улучшения методик разделения называется *оптимизацией* разделения. В этой главе мы начнем обсуждение вопросов оптимизации. Заодно пополним лексикон недостающими терминами. Двигаться будем постепенно, так что советую запастись терпением.

Подведем некоторые итоги предыдущих двух разделов. Итак, графическим представлением результата разделения является *хроматограмма* – зависимость сигнала детектора от времени элюирования. Хроматограмма начинается в момент ввода пробы и может быть остановлена, в принципе, в любой момент.

Каждое вещество, регистрируемое детектором, отображается на хроматограмме в виде *пика* – зависимости концентрации этого вещества в элюате от времени элюирования. Площадь пика пропорциональна концентрации вещества в пробе; коэффициент пропорциональности зависит как от самого вещества, так и от типа применяемого детектора.