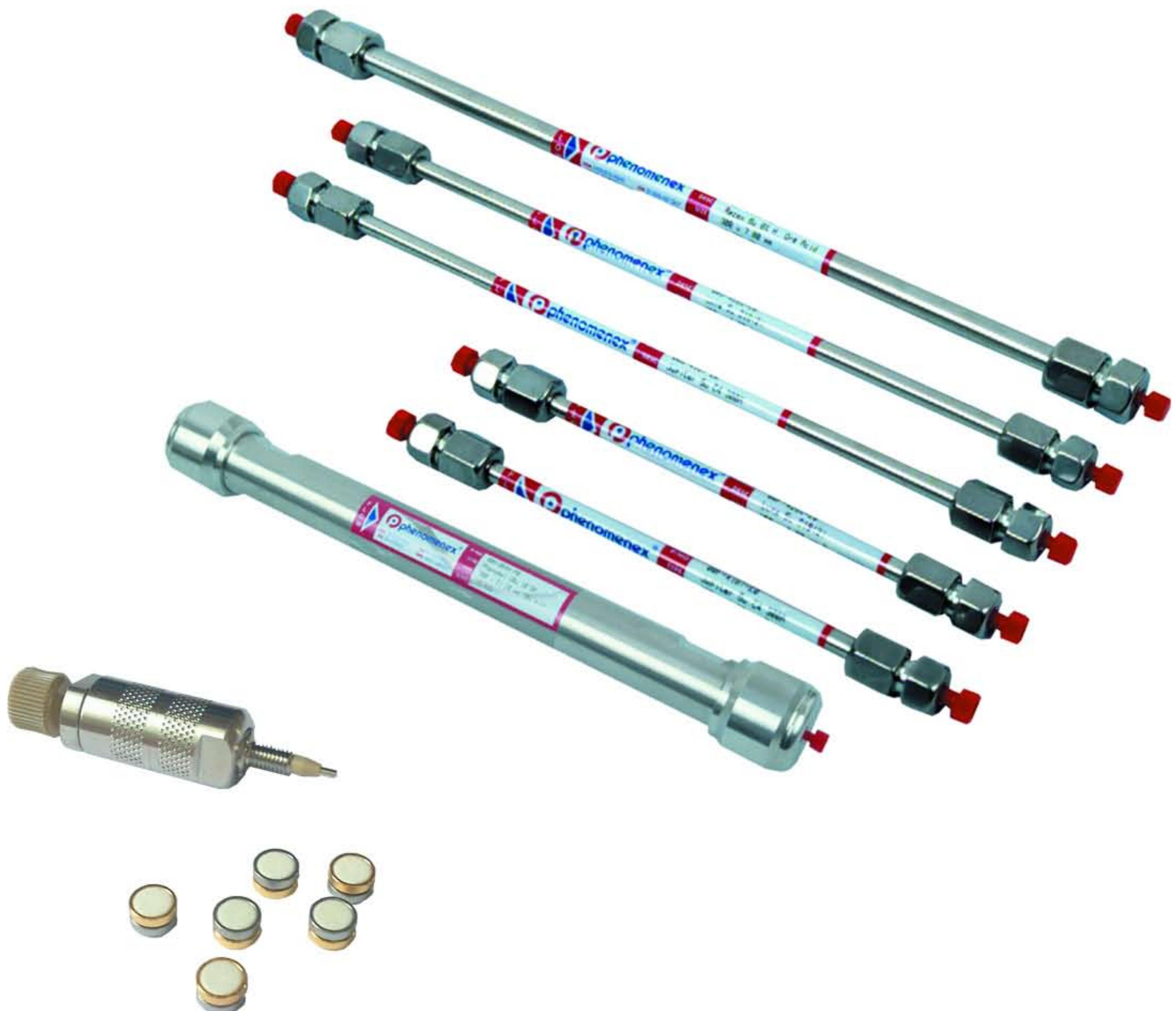




АНАЛИТИЧЕСКОЕ И ЛАБОРАТОРНОЕ  
ОБОРУДОВАНИЕ

## Особенности эксплуатации ВЭЖХ-колонок



методическое пособие

# **Особенности эксплуатации ВЭЖХ-колонок**

## **Методическое пособие**

### **СОДЕРЖАНИЕ**

1. ЧТО ПРОИЗОШЛО С ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКОЙ	2
2. НЕОБХОДИМЫЕ ДЕЙСТВИЯ ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ ВЫСОКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ	3
2.1. Три основные причины, приводящие к неисправностям колонки	3
3. ЗАГРЯЗНЕНИЕ КОЛОНКИ	5
3.1. Правильная эксплуатация обращённо-фазовой колонки	6
3.2. Использование и своевременная замена предколонок	7
3.3. Показатели, свидетельствующие о выходе аналитической колонки из строя	7
4. ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО ГЕОМЕТРИЧЕСКОГО РАЗМЕРА КОЛОНКИ	9
4.1. Применение колонок с меньшим внутренним диаметром	9
4.2. Оптимизация выбора колонки меньшей длины	11
5. ЭКСТРАКОЛОНОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ	11
5.1. Экстраколоночный объём	11
5.2. Вклад капилляров	12
5.3. Вклад детектора	14
5.3.1. Кювета детектора	14
5.3.2. Термостат детектора	15
5.4. Вклад инжекционного объема	15
5.5. Минимизация экстраколоночных эффектов	16
5.5.1. Оптимизация коэффициента емкости	16
5.5.2. Создание надежного метода	16
5.5.3. Выявление экстраколоночных эффектов	16
6. ИЗМЕНЕНИЕ СЕЛЕКТИВНОСТИ ПРИ ЗАМЕНЕ КОЛОНКИ	17
6.1. Причины изменения селективности	17
6.2. Классификация изменений селективности	17
6.3. Устранение изменений селективности	18
7. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ МЕЖДУ ПАРАЛЛЕЛЬНЫМИ ВВОДАМИ ПРОБЫ	18
7.1. Изменение удерживания и разрешения	18
7.2. Выявление и устранение потерь эффективности колонки	18
7.3. Плохая воспроизводимость удерживания в системах градиентного элюирования	19
8. КАК РЕГЕНЕРИРОВАТЬ ЗАГРЯЗНЁННУЮ КОЛОНКУ	21
8.1. Симптомы загрязнения колонки	21
8.2. Процедура регенерации колонки	21
9. ЗАЩИТА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ	21
10. УХОД ЗА КОЛОНКАМИ И ИХ ХРАНЕНИЕ	22
10.1. Выбор подвижной фазы для работы на колонке	22
10.2. Подвижная фаза для хранения	23
11. ПРИЛОЖЕНИЕ 1	23
12. ПРИЛОЖЕНИЕ 2	25

## **1. Что произошло с хроматографической колонкой?**

Данный раздел представляет собой краткий справочник по идентификации и предупреждению возникновения проблем, связанных с хроматографической колонкой. Многие пункты, описанные здесь, обсуждаются более подробно в последующих разделах данного методического пособия.

Хроматографическая колонка является сердцем хроматографической системы. При возникновении проблем с разделением часто бывает очень сложно определить, связаны ли они с самой колонкой или с другими элементами хроматографической системы. Часто во всём винят именно колонку, хотя в большинстве случаев эти проблемы вызваны другими факторами, например, изменениями состава подвижной фазы, ее расхода, колебаниями температур в системе и окружающей среде, различием образцов и т.д.

При возникновении проблем, приводящих к неисправности колонки, необходимо предпринять своевременные грамотные действия по устранению ее причины, чтобы избежать этого в будущем. Казалось бы, установление истинной причины является сложной задачей. На самом деле число причин, приводящих к потере эффективности колонки, не столь велико.

В следующих таблицах приведено несколько наиболее общих проблем, приводящих к неисправности колонки, вместе с возможными причинами и способами их грамотного устранения. Обращаясь к данным таблицам, вы сможете точно определить причину неисправности и устраниить её.

<b>Проблема: слишком высокое давление в системе</b>	
<b>Возможная причина</b>	<b>Необходимые действия</b>
1. Загрязнён входной фрит колонки	Промойте колонку медленным обратным потоком подвижной фазы (в 5 - 6 раз меньшим, чем рабочий прямой поток) для удаления механических частиц или замените входной фрит
2. Загрязнён фильтрующий элемент "in-line" фильтра (предколоночного фильтра) между инжектором и колонкой	Замените фильтр
3. Загрязнена предколонка	Замените предколонку
4. Используется колонка с меньшим внутренним диаметром	Уменьшите расход подвижной фазы
5. Колонка набита сорбентом с меньшим размером частиц	Используйте более короткую колонку

### **Причины, не связанные с колонкой:**

неисправен тензопреобразователь, загрязнено устройство ввода пробы (инжектор), забит капилляр, загрязнена ячейка детектора, увеличена объёмная скорость.

<b>Проблема: время удерживания одного и того же пика заметно (более чем на 10%) изменяется</b>	
<b>Возможная причина</b>	<b>Необходимые действия</b>
1. Загрязнение колонки	Промойте или замените колонку
2. Потеря привитой фазы	Замените колонку
3. Колонка не уравновешена	Промойте колонку подвижной фазой, объемом, равным не менее семи геометрических объемов колонки
4. Колонка перегружена	Уменьшите количество вводимого образца

### **Причины, не связанные с колонкой:**

изменен расход или состав подвижной фазы, колебания температуры.

<b>Проблема: снижается эффективность (число теоретических тарелок)</b>	
<b>Возможная причина</b>	<b>Необходимые действия</b>
1. В колонке образовалось пустое пространство (проседание сорбента или образование канала)	Замените колонку
2. "Износилась" предколонка	Замените предколонку

**Причины, не связанные с колонкой:**

экстраколоночные эффекты (повреждение или неправильная установка фитингов и соединений), увеличение объёма вводимого образца, растворение образца в другом, более сильном по элюирующей способности, чем подвижная фаза, растворителе, изменения в составе подвижной фазы.

<b>Проблема: пики «хвостят» или «двоются»</b>	
<b>Возможная причина</b>	<b>Необходимые действия</b>
1. Загрязнена колонка	Промойте или замените колонку
2. Входной фрит колонки забит механическими примесями	Замените входной фрит колонки
3. Потеря привитой фазы	Замените колонку
4. Проседание сорбента	Замените колонку
5. Образование канала в сорбенте	Замените колонку
6. Износилась предколонка	Замените предколонку

**Причины, не связанные с колонкой:**

экстраколоночные эффекты (повреждённые или неправильно установленные фитинги/соединения), колонка перегружена, изменения состава подвижной фазы (концентрации буферного раствора, pH, количества ион-парного реагента и т.д.).

<b>Проблема: неидентифицируемые («лишние») пики</b>	
<b>Возможная причина</b>	<b>Необходимые действия</b>
1. Проба содержит много различных сопутствующих (в том числе неисследуемых) компонентов	Проверьте калибровку, при необходимости переделайте анализ методом добавки или внутреннего стандарта
2. Загрязнена колонка	Промойте или замените колонку
3. Износилась предколонка	Замените предколонку

**Причины, не связанные с колонкой:**

примеси в подвижной фазе, сопутствующие компоненты в пробе, воздушные пузырьки в хроматографической системе, нарушения работы электрической части прибора.

## **2. Необходимые действия по обеспечению высокой эффективности хроматографической колонки**

### **2.1. Три основные причины, приводящие к неисправностям колонки**

Большинство пользователей хроматографических колонок хотели бы максимально продлить срок службы данных элементов. Далее будут рассмотрены три основные причины выхода из строя наиболее распространённого на сегодняшний день типа колонок – колонок, заполненных обращённофазными сорбентами.

#### **2.1.1. Потеря химически привитой фазы**

В настоящее время около 90% всех анализов методом ВЭЖХ выполняются на химически привитых фазах, главным образом на фазах с привитыми алкильными группами (обращёнными). Разрушение химических связей между привитыми группами и силикагельной матрицей приводит к изменению времён удерживания и разрешения, а также к тому, что пики «хвостят».

**Причина:** гидролиз силоксановых связей силикагелевой матрицы с привитыми группами или эндкаптирующим реагентом, применяемым для устранения влияния

остаточных силанольных групп на поверхности силикагеля. Гидролиз наиболее ярко выражен при использовании подвижных фаз с  $\text{pH} < 3$  (рис.1).

Предотвращение: при необходимости применения сильноислых подвижных фаз ( $\text{pH} < 3$ ) следует использовать предназначенные для этого колонки (в том числе и с силикагельной матрицей), например, обращенно-фазовые колонки серии «Luna» компании «Phenomenex». Данные изделия способны стабильно работать в диапазоне  $\text{pH} 1,5 - 10$  благодаря высокой чистоте используемого силикагеля и однородности его покрытия привитыми группами. Обычные же колонки допускают работу с подвижными фазами,  $\text{pH}$  которых лежит в диапазоне 3 – 7. При работе вблизи нижней границы данного диапазона избегайте температур подвижной фазы выше 60 °C.

На параметры, по значениям которых оценивают состояние колонки: коэффициент ёмкости, селективность, коэффициент асимметрии. Расчет и оценка данных параметров приведены в разделе 3.3.

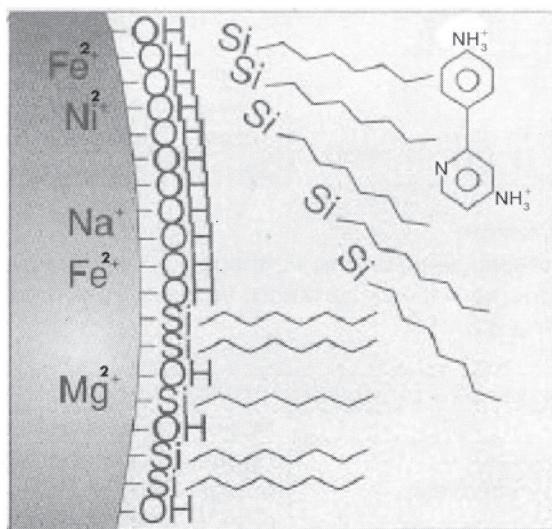


Рисунок 1. Гидролиз силоксановых связей обуславливает потерю привитой фазы

### 2.1.2. Образование пустого пространства в колонке

Образование пустого пространства на входе в колонку, вызванное проседанием сорбента, приводит к резкому снижению эффективности колонки (резкому уменьшению числа теоретических тарелок  $N$ ), а также к ухудшению разрешения, увеличению размывания пиков, их расщеплению на дублеты и появлению "хвостов".

Причины: а) повышенное (более допустимого) давление на входе в колонку или гидравлический удар (одна из наиболее часто встречающихся причин), вызванный резким сбросом давления через кран сброса/готовности линии или входной фитинг колонки; б) плохо набитые колонки, "проседающие" в процессе использования; в) растворение силикагелевой матрицы в результате использования подвижных фаз с высоким значением  $\text{pH}$ .

Предотвращение: поддерживайте в системе давление, не превышающее 170-190 бар. Не допускайте скачков давления. Помните, что при смене колонки или подвижной фазы необходимо дождаться снижения давления до 10-15 бар, и только после этого приступить к демонтажу колонки и промывке системы. При проседании колонки, вызванном гидравлическим ударом (сорбент на входе проседает обычно более чем на 1-2 мм), хроматографические параметры ухудшаются скачкообразно. В этом случае производитель (поставщик), как правило, несет гарантийных обязательств, так как подобные действия являются грубейшим нарушением условий эксплуатации любой (не только обращенно-фазовой) колонки для жидкостной хроматографии.

Приобретайте хроматографические колонки у надёжных и известных поставщиков, документально обеспечивающих качество своей продукции (наличие паспорта и гарантий). Проседание сорбента, вызванное плохой набивкой, как правило происходит в процессе первичной эксплуатации изделия, т.е. при тестировании производителем (поставщиком) или в период действия гарантии.

При использовании подвижной фазы с  $\text{pH} \geq 7$  её температура не должна превышать  $40^\circ\text{C}$  во избежание растворения силикагелевой матрицы (рис. 2).

При необходимости применять щелочные подвижные фазы ( $\text{pH} \geq 7$ ) используйте специально предназначенные для этого силикагелевые колонки (обращенно-фазовые колонки серии «Luna» компании «Phenomenex» способны стабильно работать вплоть до  $\text{pH}=10$ ) или колонки на полимерной основе. Для остальных колонок  $\text{pH}$  подвижной фазы не должен превышать 7.

**Информативные параметры:** число теоретических тарелок, коэффициент асимметрии.

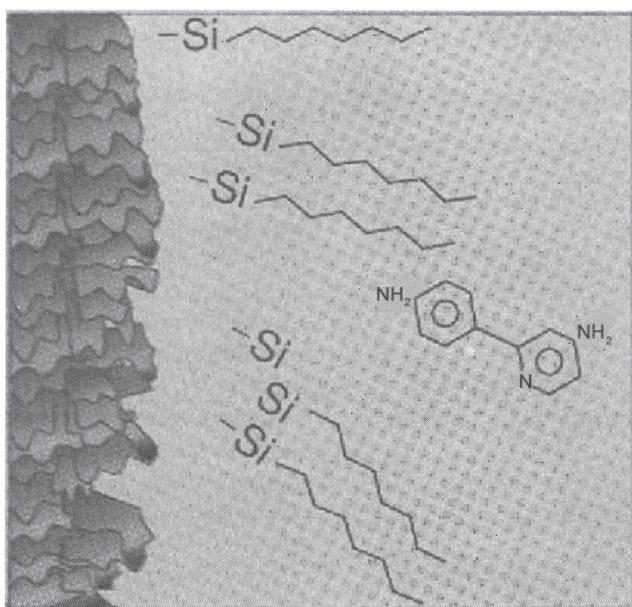


Рисунок 2. Полное растворение силикагелевой матрицы при  $\text{pH} > 7$

### 3. Загрязнение колонки

Одной из возможных причин неисправности колонки может стать очень прочное удерживание на привитой фазе отдельных компонентов пробы или подвижной фазы. Это приводит к ухудшению разрешения и изменению времён удерживания пиков. Это также может пагубно влиять на форму пиков. Механические примеси и выпавшие в осадок компоненты пробы или соли буферных растворов также могут испортить колонку, забивая входной фрит или сорбент.

**Причины:** а) проба содержит компоненты, не смывающиеся с колонки подвижной фазой данного состава. Это часто наблюдается при использовании подвижных фаз с малым содержанием органического компонента; б) примеси в подвижной фазе адсорбируются на неподвижной фазе колонки. Это часто происходит при использовании ион – парных реагентов или других добавок в сочетании с подвижной фазой с малым содержанием органической составляющей и изократическим режимом элюирования; в) механические примеси в пробе или подвижной фазе, забивающие входной фрит колонки.

**Предотвращение:** очистка образца перед инъекцией, подразумевающая фильтрацию или центрифugирование образца для удаления механических примесей и твердофазную экстракцию для удаления сильно удерживаемых компонентов пробы.

Используйте только особо чистые растворители и реактивы для подвижной фазы и не забывайте фильтровать буферные растворы. По возможности откажитесь от применения ион-парных реагентов.

В качестве ион-парных реагентов при работе на обращенной фазе не используйте вещества, содержащие в углеродных цепях более восьми атомов углерода (например, применение тетрадециламмоний бромида приводит к его необратимой сорбции на обращенной фазе).

Для того чтобы смыть сильно удерживаемые примеси с неподвижной фазы колонки, промойте её в течение продолжительного времени сильным растворителем (таким как 100-процентный ацетонитрил).

Поместите в линию между инжектором и колонкой предколонку, которая будет адсорбировать несмывающиеся компоненты и защищать аналитическую колонку. Не забывайте своевременно менять предколонки.

**Информативные параметры:** число теоретических тарелок, коэффициент ёмкости, селективность, давление на колонке.

### 3.1. Правильная эксплуатация обращенно-фазовой колонки

Действия	Комментарии
Сводите к минимуму скачки давления в хроматографической системе	Ввод пробы осуществляйте резким поворотом ручки инжектора для снижения гидравлического удара. Обеспечьте наименьшую пульсацию насосов, вызванную, как правило, непостоянной объёмной скоростью подвижной фазы (фаза не дегазирована). Избегайте гидравлических ударов.
Используйте предколонку и\или "inline" фильтр с диаметром пор 0,5 мкм	Подсоедините их в линию между инжектором и аналитической колонкой. Фильтр задержит крупные механические частицы, а предколонка предотвратит попадание сильно удерживаемых примесей на аналитическую колонку.
Как можно чаще промывайте колонку сильным растворителем	Обычно бывает достаточно промыть колонку 100-процентным ацетонитрилом. Тем не менее, если необходим более сильный (менее полярный) растворитель, то можно применить метиленхлорид, являющийся одним из наиболее сильных растворителей в обращенно-фазовой хроматографии. При перемывке помните о совместимости растворителей и возможности образования осадков. Многие сильные органические растворители не смешиваются с водными подвижными фазами и буферами, поэтому перед использованием метиленхлорида и после него необходимо промыть колонку изопропанолом.
Перед вводом "грязной" пробы в колонку необходимо провести пробоподготовку для удаления механических частиц и сильно удерживающихся на колонке примесей	В качестве пробоподготовки используйте такие приёмы, как твердофазная экстракция, фильтрация через пористый 0,45-мкм фильтр и центрифugирование.
Колонки на силикагелевой основе используйте с подвижными фазами, pH которых лежит в диапазоне от 3 до 7	Для работы за пределами данного диапазона используйте специально предназначенные для этого силикагелевые колонки или колонки на полимерной основе.

При работе с буферными растворами используйте только свежеприготовленные буфера. Если это невозможно, добавляйте в ёмкость 100 – 200 мг/л азид натрия для предотвращения роста бактерий	Долго стоящие водные растворы быстро “зацветают”, что приводит к нестабильности базовой линии и загрязнению колонки. Помните, что азид натрия очень ядовит и по токсичности сопоставим с цианидами.
Перед хранением или транспортировкой колонки отмойте её от солей и буферных растворов и оставьте в чистом ацетонитриле	Это предотвратит выпадение осадков и рост бактерий в колонке. Кроме того, ацетонитрил является хорошим растворителем для хранения, в отличие от водных и спиртовых смесей, способных ускорять гидролиз неподвижной фазы.

### 3.2. Использование и своевременная замена предколонок

Основная роль, которую играет предколонка в вашей хроматографической системе, – роль ловушки сильно удерживающихся на аналитической колонке примесей и механических частиц. Она устанавливается в линии между инжектором и аналитической колонкой. Защищая при помощи предколонки свою аналитическую колонку, вы существенно продлеваете срок ее службы. При этом не меньшее значение имеет своевременная замена износившейся предколонки. Точно определить необходимость замены предколонки при работе с данным образцом и подвижной фазой можно лишь при наличии соответствующего опыта, однако существует несколько количественных параметров, способствующих принятию верного решения. Среди них число теоретических тарелок  $N$ , давление  $P$ , разрешение  $R_s$ .

**Внимание! Если  $N$ ,  $P$  или  $R_s$  изменились более чем на 10%, необходимо заменить предколонку.**

Даже несмотря на то, что вышеперечисленные параметры являются достоверными критериями для принятия решения о замене предколонки, нельзя быть на сто процентов уверенным в том, что предколонка должным образом защищает вашу аналитическую колонку. Аналитическая колонка может загрязняться из-за перенасыщения предколонки и без видимого изменения вышеперечисленных параметров. Поэтому лучше произвести замену предколонки как можно раньше. В отсутствие иной информации хорошей привычкой является замена предколонки после 150 вводов пробы или 1000 объёмов подвижной фазы (в зависимости от того, что быстрее произойдёт).

### 3.3. Показатели, свидетельствующие о выходе аналитической колонки из строя

К сожалению, все аналитические колонки рано или поздно выходят из строя и подлежат замене. Срок зависит от условий хроматографирования и самой колонки. Проверяя эффективность колонки, вы сможете вовремя определить износившуюся колонку и, как следствие, сделать вывод о том, с какой периодичностью её необходимо менять. Имея же представление об основных факторах, сокращающих срок эксплуатации колонки, можно предпринять шаги по его продлению. Основными информативными параметрами колонки являются: число теоретических тарелок ( $N$ ), коэффициент ёмкости ( $K'$ ), селективность ( $\alpha$ ), коэффициент асимметрии ( $A_s$ ) и гидравлический перепад давления. Многие системы сбора и обработки хроматографических данных дают возможность быстрого расчета данных параметров, существенно упрощая решение задачи.

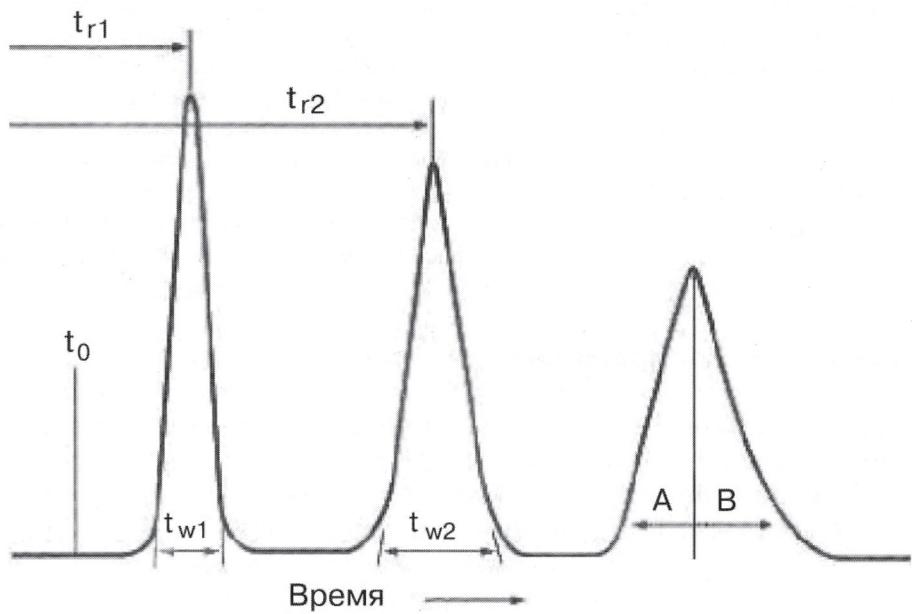


Рисунок 3. Основные хроматографические параметры

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{t_w} \right)^2; \quad k = \frac{(t_r - t_0)}{t_0}; \quad \alpha = \frac{k_2}{k_1}; \quad A_s = \frac{B}{A^*}$$

\* измерено на расстоянии 10% высоты пика от базовой линии

Число теоретических тарелок $N$ (эффективность)	Число теоретических тарелок является мерой эффективности или разрешающей способности колонки. Наиболее частыми причинами уменьшения числа теоретических тарелок являются образование полостей в колонке и её загрязнение. Пики на хроматограмме становятся шире, эффективность падает. Проверяя число $N$ , вы сможете обнаружить проблемы ещё до того, как они повлияют на разделение
Коэффициент ёмкости $k'$	Коэффициент ёмкости является мерой удерживания, не зависящей от скорости потока и размера колонки. Изменения коэффициента ёмкости при одних и тех же условиях хроматографирования указывают либо на смывание химически привитой фазы с колонки, либо на загрязнение колонки несмыывающимися примесями. Как бы то ни было, изменения коэффициента ёмкости могут быть вызваны изменениями состава подвижной фазы, что часто приводит к ошибочному мнению о неисправности колонки
Селективность $\alpha$	Селективность, являясь одним из важнейших параметров разделения двух отдельно взятых веществ, характеризует их относительное удерживание. Изменение селективности является ещё одним свидетельством смывания привитой фазы, загрязнения колонки или изменения состава подвижной фазы

Коэффициент асимметрии A	Коэффициент асимметрии является мерой симметричности пика. Увеличение коэффициента асимметрии (появление "хвоста") пика указывает на возможное образование полости в колонке, но также может быть вызвано взаимодействием полярного образца с силанольными группами силикагеля в результате смывания привитой фазы
Давление на колонке P	Увеличение давления на колонке указывает, как правило, на то, что входной фрит забился механическими частицами. Кроме того, увеличение давления на колонке может быть связано с загрязнением выходного фрита частицами, образовавшимися в результате разрушения сорбента

## 4. Выбор оптимального геометрического размера колонки

Многие хроматографисты изначально отдают предпочтение колонкам 250x4,6 мм для разработки метода разделения, так как они обеспечивают прекрасное разрешение и приемлемое время анализа. Когда речь идёт о разработке метода для рутинного анализа, необходимо рассмотреть все возможные варианты для выбора единственного, обеспечивающего наименьшие время и стоимость анализа.

### 4.1. Применение колонок с меньшим внутренним диаметром

Доступность аналитических колонок с внутренним диаметром менее 4,6 мм обеспечивает хроматографисту возможность разработать более экономичный метод. Колонки с внутренним диаметром 3,0 мм и 2,0 мм обладают рядом преимуществ:

#### **снижение расхода подвижной фазы**

- меньшие затраты элюента
- меньшая стоимость анализа

#### **минимизация ввода образцов, количество которых ограничено**

- колонки с внутренним диаметром 3 мм допускают уменьшение количества вводимого вещества приблизительно в 2 раза
- колонки с внутренним диаметром 2,0 мм допускают уменьшение количества вводимого вещества приблизительно в 5 раз

#### **снижение объёма пробы**

- могут использоваться пробы меньшего объёма
- требуется меньшее количество реагентов на пробоподготовку

#### **лучшая совместимость со специфическими детекторами**

- ЖХ\МС
- ЖХ\ЯМР.

К недостаткам перехода на колонки меньшего диаметра следует отнести **ощутимое снижение эффективности** за счет увеличения вклада в размывание пика коэффициента поперечной диффузии, а также **снижение воспроизводимости** результатов анализа за счет большей ошибки при вводе малых количеств вещества.

#### 4.1.1. Зависимость расхода подвижной фазы от внутреннего диаметра колонки

Единственный способ снизить потребление подвижной фазы – это использовать колонки с меньшим внутренним диаметром, чем стандартный 4,6 мм. Колонки с внутренним диаметром 3 мм и 2,0 мм снижают расход подвижной фазы на 60 – 80%. В таблице 1 приведена зависимость потребления подвижной фазы от внутреннего диаметра колонки и её объёма.

Таблица 1

Размеры колонки, мм	«Мертвый» объём колонки, мл	Объём пика, мкл	Потребление элюента, мл	Сэкономленный элюент, %
4,6x250	2,50	550	18,9	0
4,6x150	1,50	430	11,4	40
3,0x250	1,06	240	8,0	58
3,0x150	0,64	188	4,8	74
2,0x150	0,3	94	2,4	87

Уменьшение внутреннего диаметра колонки приводит к уменьшению её объёма. Именно благодаря меньшему объёму колонки мы имеем возможность снижения нагрузки на колонку, т.е. уменьшение количества и объема вводимой пробы. С уменьшением объёма колонки происходит уменьшение объёма пика (табл. 1). Иными словами, при введении одного и того же образца на колонки с внутренними диаметрами 4,6 мм и 3 мм объём пика будет меньше на колонке 3 мм, следовательно, образец будет более концентрированным. Однако следует помнить, что предел детектирования при этом не изменится, так как он определяется характеристиками детектора (см. ниже).

#### 4.1.2. Оптимизация эффективности колонок с малым внутренним диаметром

Для достижения оптимальной эффективности ( $N$ ) необходимо, чтобы ваша хроматографическая система была совместима с колонками с малым внутренним диаметром. Объём пиков заметно уменьшается с уменьшением внутреннего диаметра колонки (табл. 1). Особенно сильно несовместимость хроматографических систем оказывается для компонентов пробы с минимальным  $k'$ , объём пиков которых обычно самый меньший на хроматограмме.

Хорошо сконструированный хроматограф способен обеспечить высокую эффективность даже при объёме пика 80 мкл. Как бы то ни было, для пиков с объёмом менее 80 мкл требуется особым образом сконфигурированный хроматограф. Стандартные колонки 4,6 мм, а также 3 мм могут применяться практически с любым хроматографом и обеспечивать оптимальную эффективность. Колонки с малым диаметром 2,0 мм требуют дополнительной оптимизации хроматографа для обеспечения данной эффективности (раздел 5). Такие колонки могут использоваться только в специальных усложнённых системах, мало распространённых на сегодняшний день в лабораториях, так как на самом деле требуют не только оптимизации прибора, но и совершенно иных технологий синтеза и набивки сорбента.

#### 4.1.3. Снижение скорости потока для колонок с малым внутренним диаметром

Используя колонки с малым внутренним диаметром (<4,6 мм) в целях экономии элюента или образца, необходимо помнить, что простая замена одной колонки на другую, с меньшим диаметром, без изменения объёмной скорости подвижной фазы ухудшит разрешение, а также подвергнет риску колонку и всю хроматографическую систему. При переходе на колонку с тем же сорбентом и длиной, но с меньшим диаметром необходимо снизить объёмную скорость потока подвижной фазы для воспроизведения времён удерживания и разрешения пиков исходной хроматограммы. При переходе от колонки с диаметром  $D_1$  к колонке той же длины с меньшим диаметром  $D_2$  объёмную скорость элюента необходимо изменить, умножив на коэффициент  $X$  для воспроизведения времён удерживания и разрешения пиков, где

$$X = (D_2/D_1)^2$$

Например, при переходе от колонки 250x4,6 мм к колонке 250x3 мм объёмная скорость должна быть умножена на 0,4, так как

$$X = (3/4,6)^2 = 0,4.$$

Результаты соответствующих расчётов при переходе от колонки 250x4,6 мм к колонкам с меньшими внутренними диаметрами приведены в таблице 2.

Таблица 2

Размеры колонки, мм	Относительная объёмная скорость, мл\мин
4,6x250	1,0
3,0x250	0,4
2,0x250	0,2

## 4.2. Оптимизация выбора колонки меньшей длины

Многие хроматографисты, решившие по той или иной причине перейти к более короткой колонке с тем же размером частиц, пытаются экспериментально определить, сможет ли она обеспечить оптимальное разрешение для поставленной задачи. На самом деле, при наличии хроматографических данных, полученных на длинной колонке, в этом нет необходимости. Ряд несложных вычислений заменит утомительные процедуры смены, уравновешивания колонки и проведения пробного анализа.

### 4.2.1. Изменение разрешения (Rs)

Разрешение  $Rs$  прямо пропорционально квадратному корню из числа теоретических тарелок  $N$ . А так как число теоретических тарелок  $N$  изменяется пропорционально изменению длины колонки, то разрешение будет изменяться пропорционально квадратному корню из отношения длин колонок:

$$Rs_2 = Rs_1 \times (L_2/L_1)^{0,5}, \text{ где}$$

$Rs_2$  - разрешение второй колонки

$Rs_1$  - разрешение первой колонки

$L_2$  - длина второй колонки

$L_1$  - длина первой колонки.

### 4.2.2. Изменение времени анализа и перепада давления

По аналогии с разрешением мы можем предсказать, как будут изменяться время анализа ( $T$ ) и перепад давления ( $\Delta P$ ) с изменением длины колонки:

$$\begin{aligned} T_2 &= T_1 \times L_2/L_1, \\ P_2 &= P_1 \times L_2/L_1, \text{ где} \end{aligned}$$

$T_1$  - время анализа на первой колонке

$T_2$  - время анализа на второй колонке

$P_1$  - давление на первой колонке

$P_2$  - давление на второй колонке.

Например, при работе на колонке длиной 250 мм разрешение между двумя наиболее близкими пиками (критически разделяемыми компонентами) равняется 3,5, анализ занимает 20 минут, а давление в системе – 70 бар. Возможен ли переход на колонку 150 мм, если для данного анализа требуется разрешение не менее 2,5, и как смена колонки повлияет на время анализа и давление в системе?

$$\begin{aligned} Rs_2 &= 3,5 \times (15/25)^{0,5} = 2,7 \\ T_2 &= 20 \text{ мин} \times 15/25 = 12 \text{ мин} \\ P_2 &= 70 \text{ бар} \times 15/25 = 42 \text{ бар} \end{aligned}$$

Таким образом, видно, что колонка длиной 150 мм обеспечит необходимое разрешение, а помимо этого сократит время анализа на 8 минут, сэкономив тем самым 40% подвижной фазы, и снизит давление в системе. Вышеприведённый пример демонстрирует, как можно оперативно определить, подходит ли более короткая колонка для данного анализа.

## 5. Экстраколоночные эффекты

### 5.1. Экстраколоночный объём

С появлением новых видов колонок термин "экстраколоночные эффекты" приходится слышать всё чаще. В этой связи в данном разделе мы обсудим, что обозначает этот термин,

почему экстраколоночные эффекты важны и как они могут влиять на процесс хроматографического разделения.

Экстраколоночные эффекты находятся в тесной взаимосвязи с числом теоретических тарелок  $N$ . Имея представление об эффективности колонки, мы получаем возможность контроля вклада экстраколоночных эффектов для сохранения необходимого разрешения ( $R_s$ ).

Число теоретических колонок  $N$  (эффективность) является по сути дела суммарной мерой всех процессов и параметров, влияющих на форму (ширину) пика на хроматограмме. Суммарная ширина пика складывается из следующих компонентов:

$$V_{\text{obs}} = (V_{\text{col}}^2 + V_{\text{ec}}^2 + V_{\text{spl}}^2)^{1/2}, \text{ где}$$

$V_{\text{obs}}$  - наблюдаемая ширина пика в единицах объёма

$V_{\text{col}}$  - объём колонки

$V_{\text{ec}}$  - экстраколоночный объём

$V_{\text{spl}}$  - объём образца.

Под экстраколоночным объёмом («мертвым» объемом) следует понимать сумму инжекционного объёма, объёма «in-line фильтра» и объёмов капилляров и соединений между инжектором и колонкой, а также колонкой и ячейкой детектора (рис 4). Согласно железному правилу хроматографии, экстраколоночный объём в хроматографической системе должен быть сведён к минимуму для достижения оптимальной эффективности.

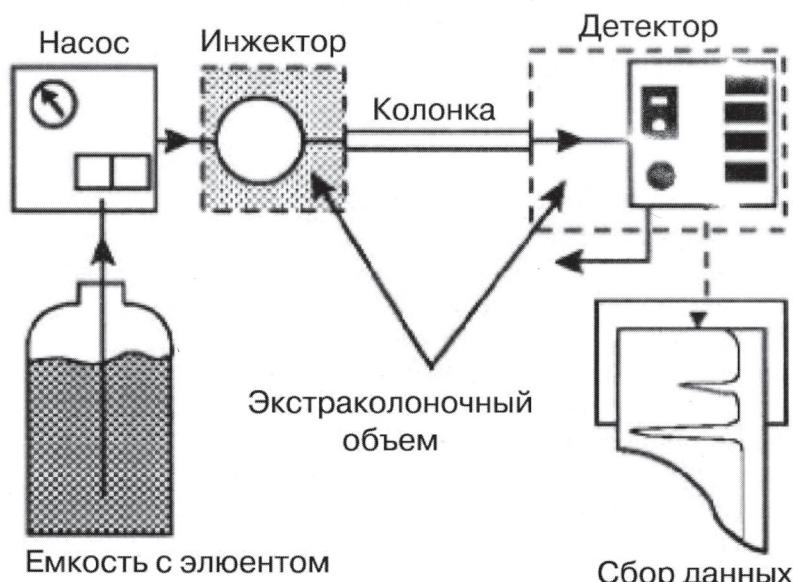


Рисунок 4. Экстраколоночный объём

Существуют два свидетельства наличия чрезмерного экстраколоночного объёма в хроматографической системе для данной колонки:

- 1) число теоретических тарелок на практике существенно меньше (на 20% и более), чем заявлено производителем;
- 2) число теоретических тарелок начальных пиков значительно меньше (на 30% и более) числа теоретических тарелок поздних пиков.

## 5.2. Вклад капилляров

Капилляр любого объёма, через который проходит образец, обуславливает смешение и, следовательно, размывание пиков, внося свой вклад в величину  $V_{\text{ec}}$ . Поток в прямом капилляре проявляет ламинарный характер и имеет характерный параболический профиль, приводящий к дисперсии образца (рис. 5).

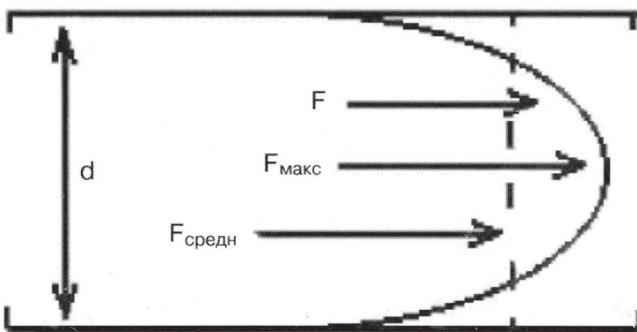


Рисунок 5. Ламинарный поток в прямом капилляре

$$\sigma^2 = 1,26 \times 10^{-3} d^4 L F / D, \text{ где}$$

$\sigma$  - дисперсия

$d$  - внутренний диаметр капилляра

$L$  - длина капилляра

$F$  - скорость потока

$D$  - коэффициент поперечной диффузии.

Для того чтобы снизить влияние дисперсии, всегда сводите к минимуму внутренний диаметр и длину капилляра между инжектором и колонкой, а также колонкой и детектором. В некоторых случаях применяют спиральные капилляры необходимой длины. Спиральный капилляр усиливает радиальную диффузию, разрушая параболический профиль потока, что, в свою очередь, заметно уменьшает диффузию в капилляре. Результатом улучшенного радиального массопереноса образца является меньшее размывание пиков по сравнению с прямым капилляром.

Разумным балансом между практическим удобством и минимальным внутренним диаметром является использование капилляров минимальной длины с внутренним диаметром 0,25 мм между инжектором и колонкой, а также между колонкой и детектором. Несмотря на то, что доступны капилляры и меньшего диаметра (0,17 мм и 0,13 мм), их следует использовать лишь в крайнем случае, так как существует повышенный риск забивания механическими примесями, присутствующими в пробе и подвижной фазе (рис. 6).

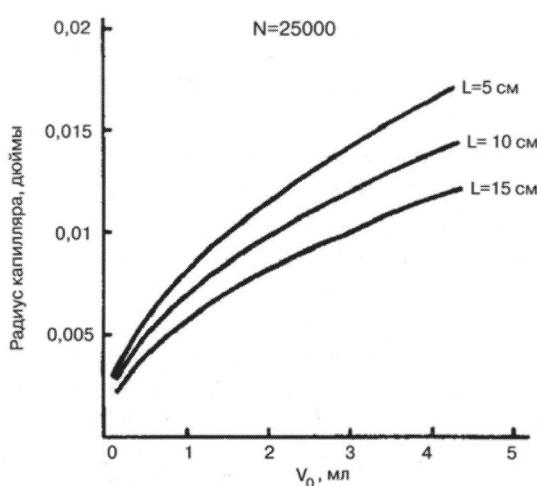


Рисунок 6. Взаимосвязь радиуса соединительных капилляров разных длин и мёртвого объёма колонки ( $V_0$ ) (1" (дюйм) = 25,4 мм)

Использование «in-line» фильтров и предколонок между инжектором и колонкой также может быть источником экстраколоночного размывания пиков. При использовании таких

фильтров всегда убеждайтесь в отсутствии у них большого мёртвого объёма. Сорбент предколонки должен быть подобран таким образом, чтобы число теоретических тарелок комбинации «предколонка – аналитическая колонка» было не меньше, чем у одной аналитической колонки.

### 5.3. Вклад детектора

#### 5.3.1. Кювета детектора

По правилам хроматографии объём кюветы детектора не должен превышать 1/10 объёма интересующего пика. Это означает, что при объёме пика 50 мкл должна использоваться кювета объёмом не более 5 мкл. На рисунке 7 приведена зависимость между объёмом кюветы спектрофотометрического детектора и эффективностью. Высокоэффективные колонки крайне чувствительны к малейшим изменениям объёма кюветы: острые пики, полученные на колонках с малым внутренним диаметром, легко теряют свои свойства, если кювета подобрана неверно. Также следует принимать во внимание геометрию кюветы, а именно её длину и радиус.

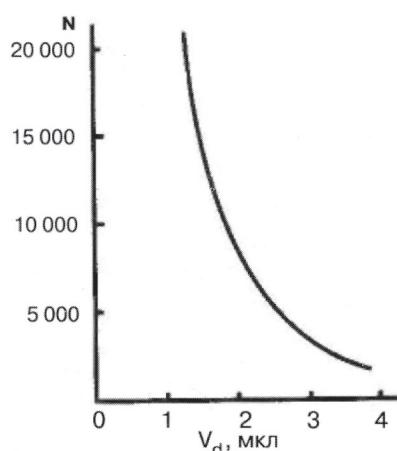


Рисунок 7. Влияние объёма кюветы детектора ( $V_d$ ) на эффективность колонки (N)

Несмотря на то, что эффективность колонок малого диаметра (с внутренним диаметром  $<=1$  мм) увеличивается при использовании кювет малого объёма, следует помнить, что меньший объём кюветы в целом означает меньшую чувствительность, так как выходной сигнал спектрофотометрического детектора прямо пропорционален длине оптического пути (ячейки малого объёма, как правило, короче). Это же правило минимизации объема кювет справедливо и для других оптических детекторов (кроме рефрактометров). Из этого следует, что маленькие ячейки ( $< 8$  мкл) должны использоваться только при крайней необходимости в минимизации дисперсии (табл. 3).

Таблица 3

Потеря эффективности, вызванная ячейками с большим объёмом			
Размеры колонки, мм	Объём ячейки, мкл	Эффективность, N/m	Потеря эффективности, %
4,6x150	1	98096	-
	8	90888	7
2,0x150	1	78077	-
	8	52939	32
1,0x150	1	56551	-
	8	16277	67

### 5.3.2. Термостат детектора

Ещё одним фактором, влияющим на размывание пиков, является термостат детектора, стабилизирующий температуру образца на входе в ячейку. Его влияние аналогично капилляру, поэтому большинство производителей используют для термостатов минимальной длины капилляры с внутренним диаметром 0,13 – 0,17 мм.

### 5.3.3. Влияние колонки

Последний вклад в наблюдаемую ширину пика делает сама колонка. Её вклад наиболее важен, и на его основании можно сделать вывод, важны или нет экстраколоночные эффекты в вашей хроматографической системе. Если величина  $V_{col}$  значительно превышает  $V_{ec}$ , то небольшие изменения  $V_{ec}$  не сильно повлияют на  $V_{obs}$ . С другой стороны, чем меньше  $V_{col}$ , тем важнее становится  $V_{ec}$ . Кроме того, как следует из таблицы 4, помимо геометрических размеров колонки, большое значение имеет также диаметр частиц сорбента, которым колонка набита.

Таблица 4

Размер колонки, мм	Диаметр частиц, мкм		
	10	5	3
	Объем пика, мкл		
4,6x250	291	206	159
4,6x150	225	159	123
4,6x100	183	129	100

### 5.4. Вклад инжекционного объёма

В тех случаях, когда образец растворён в подвижной фазе (или более слабом растворителе, чем подвижная фаза) и инжекционный объём его составляет 10 – 50 мкл, вклад образца в размывание пиков несуществен, если используются стандартные колонки 150 x4,6 мм или 250x4,6 мм. Если же в колонку вводятся образцы значительно большего объёма, чем 50 мкл, или образцы объемом более 25 мкл, растворённые в сильных растворителях, возможно снижение числа теоретических тарелок за счёт ряда инжекционных эффектов, например, искривление или расщепление пиков. Чтобы выявить это, следует уменьшить объём вводимого в колонку образца до 10-20 мкл, настроить детектор таким образом, чтобы высота пиков осталась прежней, и проверить  $N$  и  $R_s$  интересующего пика. Необходимость изменения процедуры анализа возникает в том случае, если с уменьшением объёма вводимого образца (меньший инжекционный объём и/или более слабый растворитель для образца) заметно возрастают  $N$  или  $R_s$ , влияющие на точность и воспроизводимость анализа. Вклад инжекционного объёма в размывание пиков становится более серьёзным в случае использования колонок с меньшим объёмом или для пиков с малыми  $k'$  (рис. 3). Для того чтобы поддерживать необходимую эффективность (в данном случае  $N=10000$  и  $25000$ ), максимальный введённый объём образца не может превышать мёртвый объём колонки, не вызывая при этом размывания пиков и ухудшения разделения. Чтобы не потерять эффективность, необходимо вводить образец меньшего объёма в колонки с меньшим мёртвым объёмом. Кроме того, более эффективные колонки менее устойчивы к большим объёмам пробы и легче перегружаются.

В целом, если инжекционный объём составляет не более 25% объёма интересующего пика, то потеря разрешения не должна превышать 5%. Для большинства стандартных колонок подходит объём 25–50 мкл пробы, растворённой в подвижной фазе или более слабом растворителе.

Таким образом, чтобы произвести оптимизацию хроматографической системы, необходимо запомнить следующие общие правила:  
**объём ячейки детектора:** ~ 1\10 объёма пика;  
**инжекционный объём:** ~1\10 объёма пика;  
**коммуникации:** общее стремление к минимизации длины и диаметра.

## 5.5. Минимизация экстраколоночных эффектов

Существуют три основных способа исключения проблем, связанных с экстраколоночными эффектами:

- следовать вышеприведённым советам по оптимизации хроматографической системы;
- работать в той области хроматограммы, где экстраколоночные эффекты минимальны;
- создать такой метод разделения, при котором экстраколоночные эффекты не имели бы большого значения.

Поскольку первый способ уже был подробно описан, сконцентрируем внимание на двух других.

### 5.5.1. Оптимизация коэффициента ёмкости для снижения влияния экстраколоночных эффектов

Увеличение объема кюветы детектора гораздо более ощутимо для пиков мало-удерживаемых компонентов (компонентов с низким  $k'$ ). Это связано с тем, что поздние пики имеют больший объём и, следовательно, менее подвержены влиянию экстраколоночных эффектов. Данное обстоятельство следует использовать как преимущество, если создать метод разделения, при котором критические пики имели бы  $k'$  больше 4. В первую очередь это касается колонок малого диаметра и коротких колонок, а также колонок с мелким размером частиц сорбента.

### 5.5.2. Создание надёжного метода

С другой стороны, можно подобрать такие условия разделения, при которых экстраколоночные эффекты не будут иметь значения. Имеется в виду такой запас разрешения, при котором значительная потеря разрешения и эффективности, вызванная экстраколоночными эффектами, не снизит точность и воспроизводимость анализа. Часто такой метод называют надёжным. Например, если для разделения необходимо добиться разрешения  $R_s = 1,25$ , то не составит большого труда создать метод с разрешением  $R_s = 1,8$ . Тем самым будет создан достаточный запас разрешения на случай экстраколоночных эффектов или изнашивания колонки.

### 5.5.3. Выявление экстраколоночных эффектов

Простым способом выявления экстраколоночных эффектов в вашей хроматографической системе является сравнения числа теоретических тарелок ранних пиков ( $k' < 2$ ) с числом теоретических тарелок последних пиков на хроматограмме. Как видно из рисунка 8, в первом случае число  $N$  для первого пика составляет примерно 40% от числа  $N$  последнего пика, тогда как во втором случае из-за экстраколоночных эффектов число  $N$  первого пика составляет лишь 6% от числа  $N$  последнего.

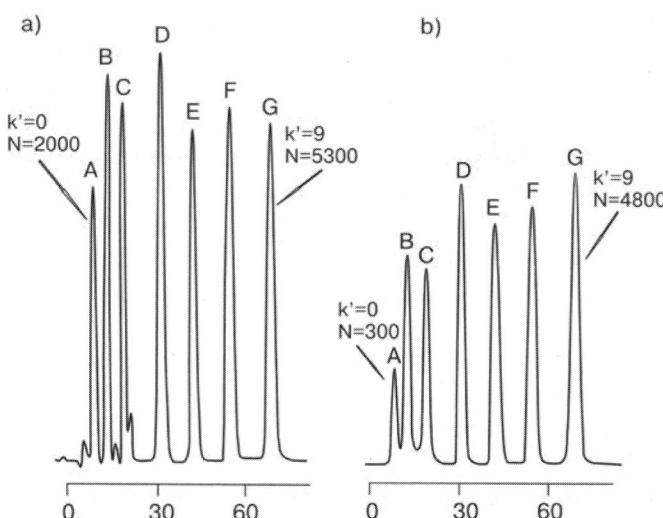


Рисунок 8. Экстраколоночные эффекты

Если наблюдаются кардинальные изменения числа теоретических тарелок при изменении времени удерживания, то в целях устранения экстраколоночных эффектов необходимо:

- 1) уменьшить инжекционный объём;
- 2) установить более низкую временную константу на детекторе;
- 3) уменьшить внутренний диаметр и длину коммуникаций;
- 4) по возможности использовать детектор с меньшим объёмом ячейки.

Если производить замены по очереди, то можно выявить истинную причину проблемы для последующего её устранения.

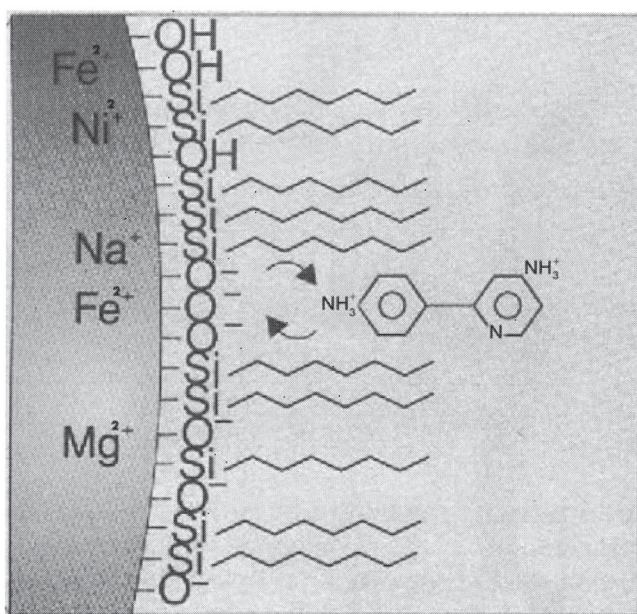
## 6. Изменение селективности при замене колонки

Изменение селективности при переходе на новую колонку может вызвать ряд негативных последствий, например, ухудшение разрешения. Как определить, чем вызваны эти изменения и как устраниТЬ проблему?

### 6.1. Причины изменения селективности

Изменения селективности колонки вызваны изменениями взаимодействия компонентов пробы с химически привитой фазой или силикагелевой матрицей сорбента. Взаимодействия с привитой фазой имеют гидрофобную природу.

Удерживание зависит от длины химически привитых алкильных групп (C18, C8 и т.д.) и степени покрытия ими матрицы. Также возможны взаимодействия между компонентами пробы и активными силанольными центрами или примесями металлов на поверхности силикагелевой матрицы. Примеси металлов увеличивают кислотность силикагеля, в результате чего остаточные силанольные группы депротонируются даже при низких значениях pH и сильно взаимодействуют с основными веществами (рис. 9) Незначительные изменения матрицы могут вызвать кардинальные изменения селективности, а также формы пиков, в особенности у основных соединений.



\* Рисунок 9. Депротонирование остаточных силанольных групп на поверхности силикагеля

### 6.2. Классификация изменений селективности

Большие различия значений  $\alpha$  ( $>10\%$ ) для двух гидрофобных соединений, например, антрацена и нафталина, указывают на различия привитой фазы.

Большие различия селективности для гидрофобного и полярного веществ основной природы (например, толуола и диметиланилина) указывают на различие свойств матрицы сорбента.

### 6.3. Устранение изменений селективности

Возникновение проблем с селективностью в случае полярных слабоосновных и слабокислых веществ, как правило, вызвано некорректным вводом образца (образец растворен не в подвижной фазе, pH и ионная сила раствора не обеспечивают полного протонирования/депротонирования исследуемых компонентов и т.д.). В некоторых случаях изменение селективности связано с влиянием остаточных активных силанольных групп сорбента. Для его устранения следует установить pH подвижной фазы около 3 и/или добавить в элюент 10–50 мМ триэтиламина (ТЭА). Это позволит «закрыть» остаточные силанольные группы на поверхности силикагелевой матрицы. Все эти действия значительно улучшат воспроизводимость анализа при смене колонок для таких веществ. Оптимальным же решением в данном случае было бы использование специальных колонок со сверхочищенной силикагелевой матрицей и двойным покрытием функциональными группами (например, колонки Luna C18(2) или C8(2) компании «Phenomenex»), обеспечивающими уникальную воспроизводимость при анализе полярных соединений. Изменения селективности за счёт привитой фазы могут быть устранены при помощи варьирования силы элюента (содержания органического компонента).

## 7. Воспроизводимость между параллельными вводами пробы

### 7.1. Изменение удерживания и разрешения

Если время удерживания ( $t_r$ ) или разрешение ( $R_s$ ) пиков не воспроизводятся от анализа к анализу и даже ото дня ко дню, то точность данного хроматографического метода не может считаться удовлетворительной. Плохая воспроизводимость вызвана, как правило, либо изменениями в условиях хроматографирования, либо изменением эффективности колонки (табл. 5).

Таблица 5

Причины плохой воспроизводимости	
Изменения условий хроматографирования	Изменения эффективности колонки
Изменение подвижной фазы: - pH - процент органической составляющей - концентрация буферного раствора - концентрация добавок (ион-парного реагента) - профиль градиента	Недоуравновешивание  Перегрузка
Изменение температуры	Загрязнение колонки
Изменение скорости потока	Потеря привитой фазы

### 7.2. Выявление и устранение потерь эффективности колонки

Проблемы с воспроизводимостью, вызванные изменением эффективности колонки, выражаются обычно изменением удерживания и/или ухудшением симметрии пика. В таблице 5 приведены возможные причины плохой воспроизводимости анализов, связанных с колоночными изменениями, а также наиболее вероятные симптомы и необходимые действия по их предотвращению.

Таблица 6

<b>Устранение плохой воспроизводимости по удерживанию</b>		
<b>Причины плохой воспроизводимости</b>	<b>Симптомы</b>	<b>Необходимые действия</b>
Недоуравновешенная колонка	Постоянное увеличение или уменьшение времени удерживания. Неправильная форма пика.	1). Уделяйте больше времени уравновешиванию колонки. Перед вводом пробы промойте колонку как минимум 15 объёмами подвижной фазы (35 мл для колонки 250x4,6 мм). 2). Если для анализа необходим слабый элюент, промойте колонку сначала более сильным растворителем.
Загрязнённая колонка	Уменьшение времени удерживания. Неправильная форма пика. Увеличивающееся давление (возможно).	1). Промойте колонку обратным током сильного растворителя с расходом в 5 раз меньшим по сравнению с рабочим. 2). Если промывка не помогает, замените колонку. 3) В следующий раз используйте предколонку.
Потеря привитой фазы	Систематическое изменение (обычно уменьшение) времени удерживания. Неправильная форма пика.	1). Замените колонку, если она больше не удовлетворяет вашим запросам. 2). Используйте специальные колонки, стабильные в широком диапазоне pH.
Перегрузка колонки	Уменьшение времени удерживания при увеличении массы введённого образца. «Хвостящие» пики.	1). Разбавьте пробу перед вводом. 2). Подберите колонку с большим внутренним диаметром.

Несмотря на то, что приведённая в таблице информация относится к хроматографическим системам как изократического, так и градиентного элюирования, при градиентном элюировании есть ряд дополнительных особенностей.

### **7.3. Плохая воспроизводимость удерживания в системах градиентного элюирования**

Системы градиентного элюирования обладают рядом преимуществ при анализе сложных смесей, содержащих компоненты, сильно отличающиеся по полярности. При градиентном элюировании состав подвижной фазы изменяется в соответствии с профилем задаваемого градиента концентраций. Поэтому существует несколько особых причин плохой воспроизводимости времён удерживания именно для градиентного режима разделения.

#### **7.3.1. Недоуравновешенная колонка**

Стандартная колонка 4,6x250 мм имеет внутренний объём приблизительно 2,5 мл и требует, по крайней мере, 10–15 объёмов подвижной фазы для достижения состояния равновесия. Это необходимо учитывать при составлении программы градиента. Самая распространенная ошибка заключается в том, что по окончании градиентного элюирования колонку либо забывают смыть сильной подвижной фазой, либо после смычки задают недостаточное время для достижения равновесия, необходимое для начала следующего анализа, либо то и другое одновременно.

### 7.3.2. Загрязнение колонки сильноудерживаемыми веществами

При недостаточной скорости формирования градиента отдельные компоненты пробы могут накапливаться в колонке, постепенно загрязняя её. Например, если для анализа требуется градиент подвижной фазы с начальным содержанием органической компоненты 10% и конечным – 70%, то, чтобы смыть с колонки все компоненты пробы, этого может быть недостаточно. Необходимо создать концентрацию 75–100%. На рисунке 10 видны пики высокоудерживаемых примесей, сошедших с колонки в результате «холостого» градиента 0–100% метанола.

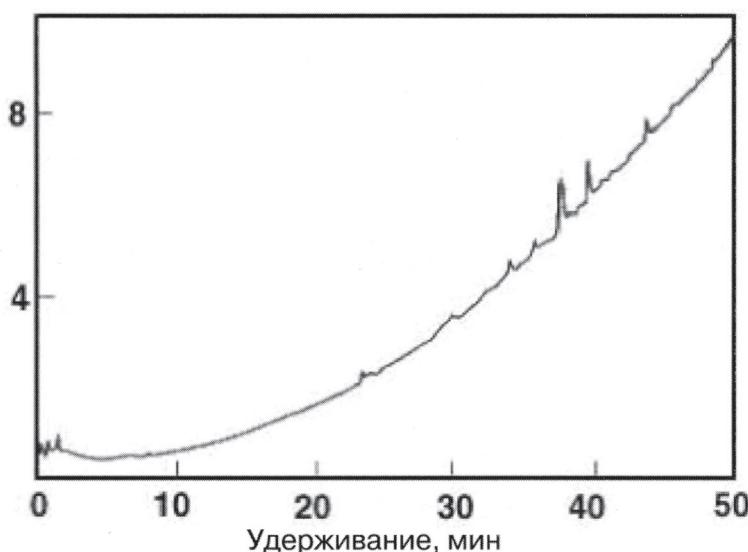


Рисунок 10. Холостой анализ, выявивший сильноудерживаемые примеси в пробе.  
Без ввода пробы: 0 – 100% метанола за 50 минут. Расход: 2 мл/мин

Если колонка сильно загрязнена, необходимо сначала промыть её обратным током с расходом в 5 раз меньшим рабочего. Отсоедините колонку от детектора, переверните её и вымойте из неё весь буферный раствор (если таковой использовался) водой. После этого перейдите на 100-процентный органический растворитель. Наиболее приемлемым для этих целей является ацетонитрил, так как в обращенно-фазовой хроматографии он обладает большей элюирующей способностью, чем метанол. Если этого оказалось недостаточно, перейдите на изопропанол, который более эффективно растворяет многие белки, пептиды и жиры и является более сильным растворителем, чем ацетонитрил или даже ТГФ. При этом помните, что вязкость изопропанола значительно выше, чем у ацетонитрила и метанола, поэтому расход, по сравнению с рабочим, должен быть снижен не менее чем в 3 - 4 раза. Кроме того, в отличие от ТГФ, изопропанол совместим с полимерными материалами, в частности с ПИИК.

### 7.3.3. Плохая воспроизводимость смешения компонентов

Данная причина относится исключительно к недостаткам конструкции хроматографических систем. Для ее устранения следует помнить, что в хроматографических системах с формированием градиента на линии высокого давления динамические миксеры обеспечивают значительно более высокую воспроизводимость смешения, чем статические смесители потока. Особенно заметно это проявляется при смешении растворителей, существенно отличающихся по вязкости. В системах градиентного элюирования с формированием градиента на линии низкого давления воспроизводимость смешения сильно зависит от степени дегазации компонентов и правильной работы соленоидных клапанов программатора градиента и геометрии камеры смешения.

## **8. Как регенерировать загрязнённую колонку**

### **8.1. Симптомы загрязнения колонки**

Во многих методах разделения используется изократический режим элюирования. При этом подвижная фаза (постоянного состава) обладает недостаточной элюирующей силой для того, чтобы смыть сильноудерживающиеся (не анализируемые) компоненты пробы с колонки. В результате накапливания несмываемых примесей на сорбенте эффективность колонки будет постепенно ухудшаться.

Основными симптомами загрязнения колонки являются:

- увеличение перепада давления;
- изменение времён удерживания;
- широкие и/или «хвостящие» пики;
- потеря разрешения.

### **8.2. Процедура регенерации колонок**

Эффективность загрязнённой колонки может быть в большинстве случаев восстановлена посредством продолжительной промывки сильным растворителем, например, 100-процентным ацетонитрилом. Если это не помогает, то следуйте инструкциям по регенерации колонок, приведённым ниже.

#### **8.2.1. Регенерация обращённофазных колонок (для колонок с внутренним диаметром 4,6 мм)**

1. Подсоедините колонку к хроматографу в противоположном направлении.
2. Промойте колонку от буферных растворов и солей обратным током 25 мл воды со скоростью 0,2 - 0,3 мл/мин.
3. Промойте колонку 25 мл изопропанола с расходом 0,2 - 0,3 мл/мин.
4. Промойте колонку 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0,5 мл/мин.
5. Промойте колонку 25 мл гексана с расходом не более 0,5 мл/мин.
6. Промойте колонку ещё раз 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0,5 мл/мин.
7. Промойте колонку ещё раз 25 мл изопропанола с расходом 0,2 - 0,3 мл/мин.
8. Подсоедините колонку в обычном направлении. Промойте колонку подвижной фазой, не содержащей буферного раствора, только после этого добавьте в подвижную фазу буферный раствор.
9. Приведите колонку в равновесие 25 - 50 мл подвижной фазы.
10. Введите пробу или стандарт чтобы убедиться, что колонка регенерирована.

Для колонок меньшего диаметра соблюдайте пропорциональное снижение расходов.

#### **8.2.2. Регенерация нормальнофазных колонок (для колонок с внутренним диаметром 4,6 мм)**

1. Подсоедините колонку к хроматографу в противоположном направлении.
2. Промойте колонку обратным током 50-мл смеси метanol – хлороформ с расходом 0,2 - 0,3 мл/мин.
3. Промойте колонку 50 мл этилацетата с расходом 0,5 мл/мин.
4. Подсоедините колонку в обычном направлении.
5. Приведите колонку в равновесие 50 мл подвижной фазы.
6. Введите пробу или стандарт, чтобы убедиться, что колонка регенерирована.

## **9. Защита хроматографической колонки**

Накапливание сильноудерживаемых примесей на сорбенте колонки может существенно сократить срок ее службы. Сокращая активную площадь поверхности неподвижной фазы, эти примеси вызывают смещение времён удерживания, ухудшение

разрешения и формы пиков. Наилучшим способом защиты аналитической колонки от подобного рода загрязнений является установка предколонки в линию между инжектором и аналитической колонкой. Рекомендуется использовать предколонки с сорбентом, аналогичным сорбенту в аналитической колонке. При этом предколонки должны быть просты в использовании и не должны снижать эффективность аналитической колонки. Для того чтобы определить, подходит ли вам та или иная предколонка, необходимо провести анализ с предколонкой и без неё. Число теоретических тарелок  $N$  для пика, полученного в результате анализа с предколонкой, не должно уменьшаться более чем на 5 % от числа теоретических тарелок пика, полученного только на аналитической колонке. Ещё одним важным параметром предколонки является её мёртвый объём. Современные предколонки состоят из универсального держателя и сменного картриджа (рис. 11). Такая конструкция позволяет максимально снизить мёртвый объём. Кроме того, один и тот же держатель может использоваться как со стандартными колонками (4,6 мм и 3 мм), так и с колонками с малым внутренним диаметром (2,0 мм).



Рисунок 11. Универсальный держатель картриджной предколонки производства компании «Phenomenex»

## 10. Уход за колонками и их хранение

Среди наиболее важных моментов при эксплуатации колонок — уход за ними и их хранение. Правильный уход за колонкой способен значительно продлить срок ее службы. Кроме того, обслуживание колонок не является обременительной задачей. Нижеприведённая информация поможет вам найти ответы на большинство вопросов относительно правильного ухода за колонкой и ее хранения.

### 10.1. Выбор подвижной фазы для работы на колонке

1). Выберите подходящий органический растворитель для подвижной фазы. Для обращенно-фазовых колонок наиболее подходящими растворителями являются ацетонитрил и метанол. Кроме того, достаточно часто используются тетрагидрофуран (ТГФ) и изопропанол. Для нормальнофазных колонок подходят гексан и метиленхлорид. Ацетонитрил, метанол и изопропанол используются как органические модификаторы основного водного раствора.

2). Выбирайте подвижную фазу таким образом, чтобы она попадала в рабочий диапазон pH данной колонки. Водородный показатель подвижной фазы определяется только в водном растворе, не смешанном с органическим модификатором.

3). Перед тем как начать работу на новой колонке, убедитесь в том, что раствор для хранения и транспортировки, который в ней находится, смешивается с вашей подвижной фазой. Никогда не начинайте работать на обращенно-фазовой колонке, если в ней находится 100-процентный органический растворитель, а ваша подвижная фаза содержит буферный

раствор. Сначала промойте колонку подвижной фазой без буферного раствора, а затем добавьте в подвижную фазу буферный раствор и приведите колонку в равновесие.

## 10.2. Подвижная фаза для хранения

Никогда не оставляйте колонку на хранение, если в ней находится буферный раствор, так как он может выпасть в осадок и испортить колонку. Буферный раствор может также вызвать рост бактерий и привести тем самым в негодность фриты и сорбент. Это наиболее вероятно при высоких содержаниях в фазе буферных растворов. Кроме того, мёртвые бактерии могут вызвать появление неидентифицируемых пиков на хроматограмме. Не храните колонку, заполненную растворителями, которые легко разлагаются, например, тетрагидрофураном (ТГФ), триэтиламином (ТЭА) и трифтормукусной кислотой (ТФУ). В результате распада ТГФ образуются пероксиды, губительные для колонки. ТЭА и ТФУ могут быть загрязнены примесями, если хранились вне холодильника.

### 10.2.1. Подготовка колонки к хранению на короткий период (не более 10 суток)

Промойте колонку рабочей подвижной фазой, не содержащей буферного раствора. Так, если подвижная фаза содержала 70% ацетонитрила и 30% буфера, промойте колонку 70-процентным водным ацетонитрилом. Это предотвратит выпадение осадка и сократит время уравновешивания колонки при последующей работе.

### 10.2.2. Длительное хранение

1). Промойте колонку тем растворителем, который рекомендуется для хранения. Если рабочая подвижная фаза содержала буферный раствор, то сначала промойте колонку рабочей подвижной фазой, не содержащей буферный раствор (см. п. 1.2.1.), а затем растворителем для длительного хранения.

2). Обращённофазные колонки можно хранить заполненными 100-процентным ацетонитрилом. Если рабочая подвижная фаза содержала буферный раствор, сначала промойте колонку рабочей подвижной фазой, не содержащей буферный раствор (см. п. 1.2.1.), а затем 100-процентным ацетонитрилом. Кроме того, промывка 100-процентным ацетонитрилом способствует удалению сильно удерживаемых примесей с колонки.

## 11. Приложение 1

### Материалы колонок и коммуникаций: преимущества и ограничения

#### Титан (Ti)

Этот металл является таким же прочным, как сталь, но на 45 % легче. Он является хорошей альтернативой нержавеющей стали в ВЭЖХ, когда требуется биосовместимый (не корродирующий) металлический фрагмент. Титан является полностью физиологически инертным материалом. Он обладает уникальной высокотемпературной стабильностью, а также отличной химической стойкостью по отношению к разбавленной серной и соляной кислотам, большинству органических кислот и даже концентрированным растворам солей (включая хлорсодержащие, такие, как NaCl). Так как титан является хрупким, необходимо соблюдать осторожность при изгибе капиллярных коммуникаций. Кроме того, капиллярные коммуникации, выполненные из титана, не рекомендуется использовать с кислотами из-за опасности появления трещин. Как бы то ни было, данные ограничения не относятся к колонкам, сделанным в титановом исполнении. Единственное, что может служить сдерживающим фактором их применения, — высокая стоимость титана. Лучшей альтернативой в данном случае является PEEK.

**Избегайте:** азотной кислоты.

## **Нержавеющая сталь SS316**

Нержавеющая сталь обладает превосходными физическими и механическими характеристиками для ВЭЖХ, а также выдерживает высокие температуры, но вытравляется кислотными подвижными фазами. Колонки из нержавеющей стали для аналитической ВЭЖХ имеют толщину стенки, способную выдерживать давление вплоть до 12000 psi (816 atm) во время упаковки сорбентом. Нержавеющая сталь SS316 способна выдерживать водные растворы с широким диапазоном pH. Тем не менее, присутствие галогенов, особенно в кислотных элюентах, приводит к коррозии этого материала. Кроме того, его не следует использовать в ионообменных системах.

**Избегайте:** уксусной кислоты конц.; лимонной кислоты конц.; сульфата аммония водн.>3%; формальдегида конц.; хлоридов водн. конц.; соляной кислоты конц.; хлоруксусной кислоты; азотной кислоты конц.; щавелевой кислоты конц.; гипохлорита натрия >1%.

В целом органические растворители сами по себе не реакционноспособны. В хроматографии биологических объектов и ионной хроматографии коммуникации, колонки и фриты, выполненные из нержавеющей стали, имеют активные (катализитические) поверхности, которые способны адсорбировать (связывать на поверхности) полярные и/или заряженные компоненты образца. Этот материал также может выщелачивать реакционноспособные ионные компоненты в потоке жидкости, что приводит к потере биологической активности или даже осаждению биополимеров.

## **PEEK**

PEEK (полиэфирэфиркетон) является химически инертным, гибким и устойчивым к воздействию высокого давления и температуры (для ВЭЖХ рекомендуется верхний температурный предел 70 °C) полимерным материалом. Он значительно менее проницаем для кислорода, чем Тefлон (приблизительно в 10 раз). В ВЭЖХ PEEK имеет практически такую же широкую область применения, как и нержавеющая сталь, но при этом более удобен. Куски капилляров, выполненных из PEEK, могут с лёгкостью быть нарезаны вручную при помощи лезвия бритвы или специального резака для разрезания полимерных капилляров. Фитинги, выполненные из данного материала, могут использоваться многократно, так как ферулы из PEEK (в отличие от металлических) легко снимаются с капилляра. PEEK совместим практически со всеми растворителями, используемыми в ВЭЖХ.

Единственными растворителями, которые способны химически взаимодействовать с PEEK, являются концентрированные азотная и серная кислота.

**Избегайте:** хлороганики, например, метиленхлорида; ДМСО; концентрированных водных галогенсодержащих растворов; фтороводородной кислоты >3% водн.; азотной кислоты конц.; серной кислоты конц.; ТГФ.

Как бы то ни было, PEEK также не следует использовать с тетрагидрофураном (ТГФ), в присутствии которого и под давлением PEEK набухает. Хотя нормальное функционирование коммуникаций зависит от толщины стенок капилляров и величины рабочего давления, действие ТГФ прогрессирует и неизбежно приведёт к разрыву материала. Кроме ТГФ, диметилсульфоксид (ДМСО) и метиленхлорид (дихлорметан) также приводят к набуханию этого полимера, но, в отличие от ТГФ, их ослабляющее действие не прогрессирует. Тем не менее, необходима определённая доля осторожности при использовании этих растворителей в подвижной фазе.

## **Стекло**

Стекло (боросиликат) способно выдерживать высокое давление и крайне инертно по отношению ко всем органическим растворителям. Однако сильно кислотные или основные растворы будут травить поверхность стекла и выщелачивать высокие концентрации элементарного кремния, бора и натрия, а также по крайней мере ещё десять элементов. Благодаря низкой адсорбции белков и пептидов на поверхности стекла использование стеклянных колонок обуславливает высокий выход и не приводит к изменению формы пиков.

**Избегайте:** соляной кислоты конц.; азотной кислоты конц.; гидроксида натрия конц.

## 12. Приложение 2

### Мембранные фильтры

Механические примеси и рост микроорганизмов в буферных растворах подвижных фаз, а также в образцах могут привести к повреждениям дорогостоящего ВЭЖХ-оборудования, в том числе насосов, клапанов, колонок, детекторов и пр. Они также могут стать причиной ошибочного аналитического результата. Предварительная фильтрация образца и подвижной фазы является решающим моментом в предотвращении засорения колонки и фритов, преждевременного изнашивания клапанов и манжет, уплотнений инжектора и других элементов.

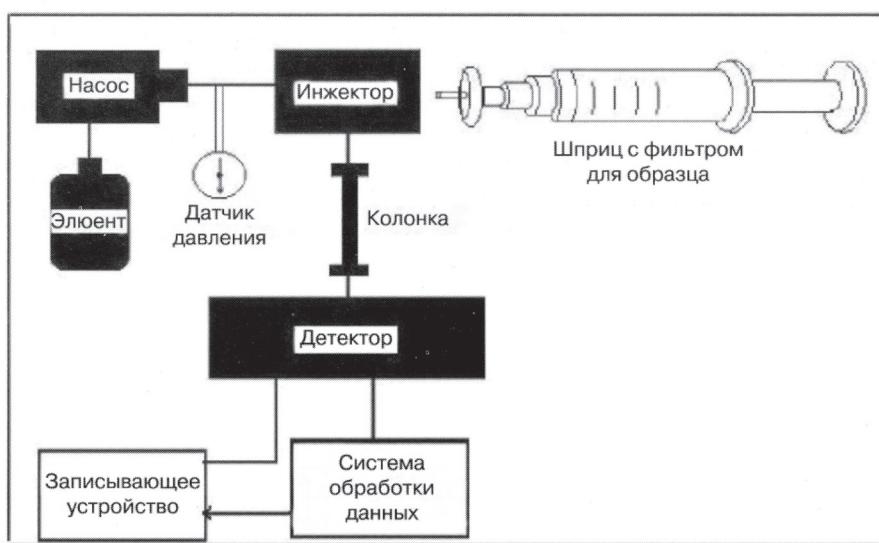


Рисунок 12. Выделенные чёрным цветом компоненты ВЭЖХ- системы могут быть выведены из строя механическими примесями.

Ниже приведены основные принципы подбора мембран для фильтрации образца и подвижной фазы.

Объём образца или подвижной фазы, мл	Мембранный фильтр (диаметр, мм)	Формат
<1	4	Шприцевой микрофильтр
1 – 10	13	Шприцевой фильтр
10 – 100	25	Шприцевой фильтр
>100	47	Мембранный диск
>1000	90	Мембранный диск

Обычно хроматографисты используют для удаления механических примесей фильтры с диаметром пор от 1,0 до 0,45 мкм. Однако существуют фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, которые одновременно с удалением механических примесей проявляют стерилизующее действие. Фильтрация на таком уровне называется микрофильтрацией.

Применение микрофильтрации	Мембрана	Комментарий
Хроматографические образцы	0,45 мкм нейлон или 0,45 мкм ПВДФ	Для общей фильтрации хроматографических образцов перед инъекцией. Удаление механических примесей из образца важно для предотвращения засорения и поломок компонентов ВЭЖХ-системы. И нейлон, и ПВДФ проявляют высокую химическую стойкость по отношению к растворителям и малоэкстрактивны. Если образец содержит большое количество механических примесей, используйте предфильтр.
Дегазация и фильтрация растворителя	1,0 мкм, 0,45 мкм или 0,2 мкм ПТФЭ	Мембранны из ПТФЭ и нейлона·инертны по отношению ко всем растворителям или кислотам. Такие мембранны идеальны для фильтрации и дегазации хроматографических растворителей, т.к. нейлон гидрофилен, и фильтрация водных подвижных фаз осуществляется легко. Предварительного смачивания не требуется. ПТФЭ (тэфлон) гидрофобен и поэтому не рекомендуется для фильтрации водных растворов.

## Химическая совместимость мембранных фильтров

Растворитель	Нейлон	ПТФЭ	ПВДФ	ПС	АЦ	РЦ	НЦ	ТАЦ	ПП
<b>Кислоты</b>									
Уксусная, ледяная	ОС	C	C	C	HC	C	HC	HC	C
Уксусная, 25 %	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Соляная конц.	HC	C	C	C	HC	HC	HC	HC	C
Соляная, 25 %	HC	C	C	C	HC	HC	OC	HC	C
Серная конц.	HC	C	HC	HC	HC	HC	HC	HC	C
Серная, 25%	HC	C	C	C	HC	OC	C	HC	C
Азотная конц.	HC	C	C	HC	HC	HC	HC	HC	C
Азотная, 25%	HC	C	C	C	HC	HC	OC	HC	C
Фосфорная, 25%	HC	C	НД	НД	C	OC	OC	C	C
Муравьиная, 25%	HC	C	НД	НД	ОС	C	C	ОС	C
TXA, 10 %	HC	C	НД	НД	C	C	C	C	C
<b>Щелочи</b>									
NH <sub>4</sub> OH, 25%	C	C	ОС	C	C	ОС	C	C	C
3NNaOH	C	C	C	C	HC	OC	HC	HC	C
<b>Спирты</b>									
Метанол, 98 %	C	C	C	C	C	C	OC	C	C
Этанол, 98 %	C	C	C	C	C	C	OC	C	C
Этанол, 70 %	ОС	C	C	C	OC	C	OC	OC	C
Изопропанол, Н-пропанол	C	C	C	C	C	C	OC	C	C
Амиловый спирт, Бутанол	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Бензиловый спирт	C	C	C	НД	ОС	C	OC	OC	C

Этиленгликоль	C	C	C	C	C	C	ОС	C	C
Пропилен-гликоль	C	C	C	C	ОС	C	HC	ОС	C
Глицерин	C	C	C	C	C	C	C	C	C
<b>Углеводороды</b>	C	C	C	HC	C	C	C	C	HC
Гексан, Ксиол									
Толуол, Бензол	C	C	C	HC	C	C	C	C	HC
Керосин, Газолин	C	C	C	ОС	C	C	C	C	ОС
Тетралин, Декалин	НД	C	C	НД	C	C	C	C	НД
<b>Галогенированные углеводороды</b>	ОС	C	C	HC	HC	C	C	HC	ОС
Метиленхлорид									
Хлороформ	C	C	C	HC	HC	C	C	HC	ОС
Трихлорэтилен	C	C	C	HC	C	C	C	C	ОС
Хлорбензол, Фреон	C	C	C	ОС	C	C	C	C	C
Тетрахлоруглерод	C	C	C	HC	ОС	C	C	ОС	ОС
<b>Кетоны</b>	C	C	HC	HC		C	HC	HC	C
Ацетон, Циклогексанон									
Метилэтилкетон	C	C	ОС	HC	ОС	C	ОС	ОС	ОС
Изопропил-ацетон	C	C	HC	HC	C	C	ОС	C	НД
Метилизо-бутилкетон	НД	C	ОС	HC	НД	C	НД	НД	ОС
<b>Сложные эфиры</b>	C	C	C	HC	HC	C	HC	HC	ОС
Этилацетат, Метилацетат									
Амил-, Пропил- и Бутилацетат	C	C	НД	HC	ОС	C	HC	ОС	ОС
Пропилен-гликольацетат	НД	C	НД	HC	HC	C	HC	HC	C
2-Этокси- этилацетат	НД	C	НД	HC	ОС	C	HC	ОС	НД
Метилцеллозольвацетат	НД	C	НД	HC	HC	C	HC	HC	C
Бензилбензоат	C	C	НД	HC	C	C	C	C	НД
Изопропил-миристат	C	C	НД	HC	C	C	ОС	C	НД
Трикрезил-фосфат	НД	C	НД	HC	C	C	ОС	C	НД
<b>Оксиды-простые эфиры</b>	C	C	C	C	C	C	HC	C	ОС
Этиловый эфир									
Диоксан, ТГФ	C	C	ОС	HC	HC	C	HC	HC	C
<b>ДМСО</b>	C	C	HC	HC	HC	C	HC	HC	C
Изопропиловый эфир	НД	C	C	C	C	C	НД	C	C

<b>Азотсодержащие растворители</b> Диметилформамид	ОС	C	HC	HC	HC	ОС	HC	HC	C
Диэтил-ацетамид	C	C	НД	НД	HC	C	HC	HC	НД
Триэтаноламин	C	C	НД	НД	C	C	C	C	НД
Анилин	НД	C	НД	НД	HC	C	ОС	HC	НД
Пиридин	C	C	C	HC	HC	C	HC	HC	ОС
<b>Разные</b> Фенол, водн., 10%	НД	C	ОС	HC	HC	HC	HC	HC	C
Формальдегид, 30%	C	C	C	C	C	ОС	C	C	C
Пероксид водорода, 30%	C	C	НД	НД	C	C	C	C	НД
Силиконовое и минеральное масло	НД	C	C	C	C	C	C	C	C

### Условные обозначения

С - совместим

ОС - ограниченно совместим (мембрана набухает и сморщивается)

HC - несовместим

НД - нет данных

ПТФЭ - Тefлон

ПВДФ - Поливинилидендифторид

ПС - Полисульфон

АЦ - Ацетат целлюлозы

РЦ - Регенерированная целлюлоза

НЦ - Нитрат целлюлозы

ТАЦ - Триацетат целлюлозы (исключение по молекулярному весу)

ПП - Полипропилен

## Совместимость материалов и их использование

<b>Материал</b>	<b>Совместимость</b>
<b>Ацетат целлюлозы (АЦ)</b>	Используется в производстве мембранных фильтров. Подходит только для водных растворов. Растворим в полярных органических растворителях. Проявляет слабую способность удерживать белки.
<b>Delrin</b>	Используется в фитингах и компонентах насоса. Не может быть использован с сильными кислотами, основаниями или окислительными агентами.
<b>Kel-F</b>	Применяется в ферулах и уплотнениях. Не рекомендуется использовать в присутствии ТГФ или четырёххлористого углерода.
<b>Нитроцеллюлоза (НЦ)</b>	Используется в мембранных фильтрах. Подходит только для водных растворов. Обладает высокой способностью удерживать белки.
<b>Нейлон 66</b>	Используется в мембранных фильтрах. Подходит для водных растворов. Мембранны из Нейлона очень гидрофильны и малоэкстрактивны.
<b>PEEK (Полиэфирэфиркетон)</b>	Применяется как материал для компонентов насоса, фитингов и коммуникаций. Не рекомендуется использовать с ТГФ, метиленхлоридом, ДМСО или сильными кислотами / основаниями. Обладает высокой механической прочностью.
<b>Полипропилен (ПП)</b>	Используется в компонентах низкого давления. Не рекомендуется использовать с органическими растворителями. Малоэкстрактивен.
<b>Полисульфон (ПС)</b>	Используется в мембранных фильтрах. Не рекомендуется использовать с органическими растворителями. Мембрана, выполненная из полисульфона, гидрофильна и не склонна к связыванию белков.
<b>Поливинилхлорид (ПВХ)</b>	Используется в мембранных фильтрах. Не рекомендуется использовать с органическими растворителями.
<b>Поливинилиденфторид (ПВДФ)</b>	Используется в мембранных фильтрах. Годится как для водных, так и неводных растворов. Гидрофобен, проявляет слабую способность удерживать белки.
<b>Нержавеющая сталь SS316</b>	Водные растворы галогенированных солей вызывают коррозию. Перед использованием должна быть пассивирована 1% азотной кислоты.
<b>Тефлон</b>	Инертен по отношению ко всем растворителям, кислотам и основаниям, используемым в ВЭЖХ. Используется на стороне низкого давления. Обладает ярко выраженной гидрофобностью.
<b>Тефzel</b>	Схож по свойствам с тефлоном, но не рекомендуется к использованию с хлорированными растворителями. Выдерживает более высокие давления.
<b>Титан</b>	Используется как материал для компонентов насоса. Устойчив к коррозии.