

К.С. Сычев

**Правильная эксплуатация
ВЭЖХ оборудования и колонок.
Поиск и устранение неполадок**

ISBN 978-5-9905567-3-7

© ИП Сычев К.С., 2019

Часть 1

- Курс 1.* Правильная эксплуатация обращенно-фазовых колонок 9
Курс 2. Работа с буферными растворами в ВЭЖХ 23
Курс 3. Состав подвижных фаз в обращенно-фазовой ВЭЖХ.
Особенности ион-парной обращенно-фазовой хроматографии 31

Часть 2

- Курс 4.* Вопросы, наиболее часто задаваемые специалисту
по методической поддержке 44
Курс 5. Вопросы, наиболее часто задаваемые специалисту
по технической поддержке. Устранение простых неполадок ВЭЖХ
оборудования 68

Часть 3

- Курс 6.* Неподвижные фазы для ВЭЖХ: основы. Общий принцип
выбора неподвижных фаз 89
Курс 7. ВЭЖХ колонка как промышленный продукт. Качество
колонки 96
Курс 8. Неподвижные фазы для обращенно-фазовой ВЭЖХ 106

Часть 4

- Курс 9.* Стандартные ошибки, допускаемые при работе с ВЭЖХ
оборудованием 118
Курс 10. Полезные подсказки для тех, кто хочет работать эффективно
и с удобством 128

Курс 11. Курьезы в ВЭЖХ. Организационные и не классифицируемые ошибки	137
--	-----

ВЭЖХ услуги и продукты компании IBS

1. ВЭЖХ услуги компании IBS. ВЭЖХ продукты компании IBS	144
2. ВЭЖХ курсы компании IBS	146
3. Порядок проведения квалификации ВЭЖХ оборудования специалистами компании IBS	155
4. Процессы, оцениваемые экспертом компании IBS при проверке готовности аналитической лаборатории к GMP инспекции	158
5. Готовые ВЭЖХ решения <i>IBS Pharm</i> [™] и <i>IBS Nutri</i> [™]	164

Краткий обзор оборудования Shimadzu для хроматографии: проверенные временем инструменты и новинки модельного ряда

Серия LC-20 Prominence.	171
УВЭЖХ-система на платформе Nexera X2.	172
Жидкостные хроматографы Nexera-I и Prominence-i	174
Краткий обзор линейки оборудования Shimadzu для молекулярной спектроскопии	191

Список рассматриваемых вопросов

Часть 1

- 1-1. Как начинать работу с новой обращено-фазовой колонкой
 - 1-2. Какого объема подвижной фазы достаточно для кондиционирования новой обращенно-фазовой колонки
 - 1-3. Чем промывать обращено-фазовые колонки
 - 1-4. Можно ли сократить время, затрачиваемое на промывку колонок
 - 1-5. Какие предосторожности необходимо соблюдать при промывке колонок
 - 1-6. В чем следует хранить обращено-фазовые колонки
 - 1-7. От чего обращено-фазовые колонки выходят из строя
 - 1-8. Каковы причины естественного износа обращенных фаз
 - 1-9. Как продлить срок службы обращено-фазовых колонок
 - 1-10. Можно ли регенерировать обращено-фазовые колонки
 - 1-11. Можно ли работать на “перевернутых” колонках
-
- 2-1. Что такое буферный раствор. Как он работает
 - 2-2. Зачем нужны различные виды буферных растворов
 - 2-3. С какой целью буферные растворы (буферы) применяют в ВЭЖХ
 - 2-4. Каковы недостатки применения буферов
 - 2-5. Как подбирать концентрацию буфера
 - 2-6. Какой буфер лучше — фосфатный или ацетатный (формиатный)
 - 2-7. Какие лучше использовать соли — натрия, калия, аммония
 - 2-8. Зачем для приготовления фосфатного буфера нередко применяют смесь однозамещенного и двузамещенного фосфата
 - 2-9. Имеет ли смысл рассчитывать состав буфера с заданным рН по формуле
 - 2-10. Зачем в фосфатный буфер добавляют хлорид натрия
 - 2-11. Каков смысл применения перхлоратов
 - 2-12. Можно ли считать буфером раствор соли триэтиламмония или какой-либо ион-парной добавки

-
- 3-1. Зачем (для приготовления подвижной фазы) применяют смесь ацетонитрила и метанола
 - 3-2. Зачем (для приготовления подвижной фазы) применяют смесь ацетонитрила и ТГФ
 - 3-3. Имеет ли смысл добавки (в подвижную фазу) бутанола
 - 3-4. Зачем (в подвижную фазу) добавляют триэтиламин
 - 3-5. Как работают добавки ион-парных реагентов
 - 3-6. Какие ион-парные реагенты наиболее популярны
 - 3-7. В каких случаях применяют добавки ион-парных реагентов
 - 3-8. Как бороться с плохой воспроизводимостью ион-парных разделений
 - 3-9. Совместимы ли ион-парные разделения и градиентное элюирование
 - 3-10. Как можно удешевить ион-парное разделение
 - 3-11. Насколько применение ион-парного режима вообще оправдано
 - 3-12. Как подбирают температуру разделения в обращенно-фазовом режиме

Часть 2

- 4-1. Отчего времена удерживания бывают нестабильны. Как бороться с нестабильностью времени удерживания
 - 4-2. Что делать, если площадь пика не воспроизводится
 - 4-3. Как бороться с “лишними” пиками на хроматограмме
 - 4-4. Что делать, если ожидаемые пики не наблюдаются
 - 4-5. Что делать, если пик расщепился. В чем причина расщепления пиков
 - 4-6. В чем причина уширения пиков
-
- 5-1. Что делать, если не работает насосная система
 - 5-2. Почему случаются течи из узлов жидкостной системы. Как с ними бороться
 - 5-3. Повышенное давление в системе: опасно ли это. Как бороться с повышенным давлением
 - 5-4. Что делать, если капилляр выбивает из колонки
 - 5-5. Причины высоких шумов (при применении УФ детектирования). Как бороться с высоким шумом
 - 5-6. Причины дрейфа базовой линии (при применении УФ детектирования). Как бороться с высоким дрейфом

Часть 3

- 6-1. Есть ли смысл в разнообразии неподвижных фаз
- 6-2. Зачем для одного вида хроматографии выпускают неподвижные фазы с различными типами прививок
- 6-3. Зачем нужны колонки различных типоразмеров, то есть разной длины и с разным размером частиц
- 6-4. Существуют ли “самые лучшие” колонки

- 7-1. Что подразумевается под “качеством” колонки. Какую колонку можно считать качественной
- 7-2. Как производят ВЭЖХ колонки
- 7-3. Какие признаки свидетельствуют о нарушениях в технологии упаковки колонок
- 7-4. В каких случаях можно попытаться заменить плохо упакованную колонку у производителя
- 7-5. Как обезопасить себя от покупки плохо изготовленной колонки
- 7-6. Какими параметрами характеризуется качество адсорбента

- 8-1. Какие основные типы обращенных фаз доступны на рынке
- 8-2. Какие существуют типы прививок для обращенно-фазовых силикагелей
- 8-3. Чем определяется величина удерживания на данной обращенной фазе
- 8-4. В чем состоит преимущество алкиламидных (C16-Amide и подобных ей) фаз
- 8-5. В чем состоит преимущество арил-привитых (PFP, PVE и подобных им) фаз
- 8-6. В чем состоит преимущество алкил-привитых фаз с ионными группами (C18/SAX, C18/SCX, C18/WCX)
- 8-7. Что такое энд-кеппинг
- 8-8. Какими преимуществами обладает полярный энд-кеппинг
- 8-9. Как узнать тип энд-кеппинга обращенной фазы
- 8-10. Что обозначают различные аббревиатуры в названиях обращенно-фазовых колонок
- 8-11. Какие бывают химии полимерных обращенных фаз
- 8-12. Почему фазы на основе силикагеля применяют чаще полимерных фаз
- 8-13. В чем состоят преимущества и недостатки применения поверхносто-пористых обращенных фаз

Часть 4

- 9-1. Неправильно организованное рабочее место
 - 9-2. Не ведется лабораторный журнал
 - 9-3. Лабораторный журнал ведется неправильно
 - 9-4. Слишком подробные записи в лабораторном журнале
 - 9-5. Не промывают жидкостную систему прибора в конце дня
 - 9-6. Плохо промывают жидкостную систему прибора от кислоты
 - 9-7. Проведение необоснованных и бессистемных промывок колонок
 - 9-8. Применение посуды из темного стекла
 - 9-9. Пренебрежение дегазированием подвижной фазы
 - 9-10. Неправильное приготовление подвижной фазы
 - 9-11. Неправильное ручное инжектирование
-
- 10-1. Эргономичная компоновка прибора
 - 10-2. Правильный выбор капилляров и фитингов
 - 10-3. Жидкостная система для “био” совместимых разделений
 - 10-4. Отдельный ВЭЖХ насос для вспомогательных операций
 - 10-5. “Круговорот” предколонок
 - 10-6. Грамотное использование системы рецикла подвижной фазы

Курс 1. Правильная эксплуатация обращенно-фазовых колонок

— Тема эксплуатации обращенно-фазовых колонок всегда вызывает наибольшее количество вопросов. В чем здесь дело?

— Дело здесь не в самой обращенно-фазовой хроматографии, а в массовости ее применения. Кроме того, другие виды хроматографии, как правило, применяют уже достаточно опытные специалисты, а среди пользователей обращенно-фазовой ВЭЖХ много новичков. Что, конечно же, замечательно — но им требуется определенная помощь.

— Хорошо. Начнем с простого вопроса: как начинают работу с новой обращенно-фазовой колонкой?

— Надо посмотреть на ее сертификат. Понять, силикагельная ли это колонка, или полимерная, или на какой-либо иной основе. Если что — не поленитесь открыть описание этой колонки на сайте производителя.

Если колонка полимерная, то у нее есть ограничение по давлению порядка 150 бар. Сразу выставьте максимальное давление в настройках насоса — иначе потом забудете.

Как правило, новые обращенно-фазовые колонки заполнены либо метанолом, либо смесью ацетонитрил-вода. Уточните это. Есть третий вариант: колонка поставлена сухой, то есть не заполненной жидкостью. В принципе, это не очень хорошо. Это значит, что колонка довольно долго лежала на складе. Для силикагельных колонок это не очень принципиально — высушивание колонки не приводит к потере ее эффективности. А вот для полимерных колонок высушивание может быть критичным фактором.

Дальше начинается начальная промывка колонки. Не путайте промывку и кондиционирование.

— *А чем промывка отличается от кондиционирования?*

— Колонку промывают либо для ее очистки от остаточного загрязнения, либо для замены текущего растворителя на какой-либо другой. Как правило, промывка производится до момента полного удаления из колонки остатков компонентов предыдущей подвижной фазы.

А кондиционирование колонки — это, по сути, выдерживание колонки в новой подвижной фазе до момента установления адсорбционного равновесия в системе, то есть до стабилизации адсорбционных свойств неподвижной фазы — удерживания и селективности. Проводить анализ можно только после завершения кондиционирования колонки.

В этом смысле промывка и кондиционирование — это не только не синонимы, а даже противоположные вещи: по идее, любая промывка любым растворителем, кроме подвижной фазы, нарушает адсорбционное равновесие, что влечет за собой необходимость заново кондиционировать колонку.

— *Хорошо, теперь все понятно. Итак, как проводить первоначальную промывку обращенно-фазовой колонки?*

— Приготовьте подвижную фазу ацетонитрил-вода 1:1. Ацетонитрил должен быть марки “для хроматографии”, то есть пригодным для работы на длине волны 200 нм.

Если к прибору в комплекте идет УФ детектор любого типа, то заранее подготовьте его к работе. На детекторе установите короткую длину волны, к примеру, 210 нм. Заполните его кювету подвижной фазой ацетонитрил-вода 1:1, которой будет промываться колонка.

— *Как это делается?*

— Не ставьте колонку на прибор сразу, а сначала соедините инжектор и детектор обычным капилляром диаметра порядка 150 мкм

и более. Для этого на оба конца капилляра надевают самые простые пластиковые фитинги и муфты (на английском — юнионы). Включите поток, и кювета детектора заполнится напрямую подвижной фазой. Затем нажмите Auto Zero, чтобы детектор принял за ноль поглощение чистой подвижной фазы. Остановите поток.

— *Хорошо. Дальше.*

— Уберите капилляр, установите вместо него хроматографическую колонку. Запустите насос. Теперь не нажимайте на Auto Zero, то есть не сбрасывайте показания детектора, а наблюдайте за ними.

Установите объемную скорость потока, которая указана в сертификате колонки в условиях проведения ее теста. Промывайте колонку минут десять до стабилизации давления (допустим, плюс-минус две-три атмосферы). Если колонка оказалось сухой, промывайте до тех пор, пока из колонки перестанут выходить видимые глазом пузырьки (для наблюдения за ними на сливе необходимо установить прозрачный тefлоновый капилляр).

Если высота фона (то есть показания детектора) через некоторое время после запуска потока (к примеру, 15–20 минут) оказывается не выше 50 mAU (mV), значит — колонка более-менее чистая. Дождитесь дрейфа менее 1–2 mAU (mV) в минуту, и начальную промывку можно считать законченной.

Далее переходите к тестированию колонки при помощи того или иного теста. Приготовьте подвижную фазу, проведите кондиционирование, проведите тестовый анализ, запишите результаты тестирования в журнал. Теперь обращенно-фазовая колонка готова к работе.

— Какого объема подвижной фазы достаточно для кондиционирования новой обращенно-фазовой колонки?

— Для начала, не следует путать кондиционирование колонки и ее промывку. Выше мы рассмотрели простой способ промывки обращенно-фазовой колонки, и он достаточно универсален.

А универсального рецепта кондиционирования колонки не существует, поскольку кондиционирование — это подготовка колонки к проведению совершенно конкретного разделения в определенных условиях. Проводится она пропуском подвижной фазы через колонку.

Колонка считается откондиционированной тогда, когда удержание всех целевых компонентов становится стабильным. Вам интересно узнать — какой объем подвижной фазы необходимо пропустить через колонку, чтобы удержание стабилизировалось?

— Да.

— Дело не в объеме пропускаемой подвижной фазы, а во времени кондиционирования. От объема пропускаемого через колонку растворителя зависит результат промывки. А при кондиционировании все определяет время, а не объем. Поэтому, если колонка надлежащим образом промыта и заполнена применяемой подвижной фазой, не имеет смысла включать слишком высокую скорость потока.

— Хорошо, тогда какое время необходимо кондиционировать новую обращенно-фазовую колонку?

— Вот это уже более корректно поставленный вопрос. В общем случае ответ такой: время кондиционирования определяется временем установления адсорбционного равновесия в хроматографической системе.

В “классической” обращенно-фазовой хроматографии на “стандартных” C18 и C8 фазах с неполярным энд-кеппингом равновесие устанавливается очень быстро, поэтому на кондиционирование таких фаз может уходить 10–15 минут, не более. Поэтому, кстати, именно эти колонки можно спокойно промывать. И именно поэтому на них хорошо и воспроизводимо получаются градиентные разделения.

— Мы коснемся этих вопросов отдельно?

— Да, и по градиенту, и по необходимости промывок — обсудим все.

— Хорошо, дальше.

— Дальше начинаются некоторые сложности. Для обращенных фаз с полярным энд-кеппингом, или же с более полярными, чем C18 и C8, прививками (например, для C16-амидных фаз), время кондиционирования может составлять от получаса до нескольких часов.

Происходит это по той причине, что адсорбент теперь содержит, кроме неполярных, еще и полярные группы; следовательно, на нем организуется некоторый адсорбционный слой, который существует в равновесии с подвижной фазой.

— *И чем более полярна неподвижная фаза, тем дольше она приходит в равновесие с подвижной?*

— Совершенно верно. Еще это зависит от целевых соединений. Соединения, содержащие в своей структуре гидрофильные нейтральные, либо ионные фрагменты (например, гликозиды, полярные метаболиты фармацевтиков), более чувствительны к адсорбционному равновесию, поэтому кондиционирование длится дольше.

Вообще, при применении C16-амидных и подобных им фаз я настоятельно рекомендую применять солевые буферы достаточно высокой концентрации (до 50 мМ). Это помогает стабилизировать разделение и уменьшить продолжительность кондиционирования.

В любом случае, применение обращенно-фазовых колонок с полярными группами накладывает некоторые ограничения на возможность их промывки — ведь после промывки их надо заново кондиционировать, то есть тратить от получаса и более.

— *Есть ли случаи, когда кондиционирование обращенных фаз занимает еще больше времени?*

— Да, когда разделение ведется в ион-парном режиме. Там кондиционирование может длиться от нескольких часов до нескольких дней. Но ион-парные режимы мы обсудим отдельно.

— *Хорошо. Вот вопрос в продолжение темы промывок: чем промывать обращенно-фазовые колонки?*

— Для начала я хочу предостеречь от тяги промывать колонку по любому поводу, а также совсем без повода. Помните, что всякого рода промывки (особенно скачанные с разных “умных” сайтов) могут убить колонку значительно проще, чем планомерная работа с одной подвижной фазой. Особенно в том случае, когда пользователь сам не совсем понимает — что он делает и что хочет этой промывкой достичь.

— *Бывает такое, что промывают колонку без повода?*

— Конечно. Например, что-то в разделении не получается, и, поскольку что делать непонятно, промывают колонку просто “на всякий случай”.

Кроме того, в ВЭЖХ полно мифов, и один из них утверждает, что паразитные (лишние) пики возникают оттого, что что-то “застряло в колонке”. И, вместо того, чтобы искать причину в загрязненной пробе или загрязненном инжекторе (включая шприц), начинают интенсивно промывать колонку. Которая вообще здесь ни при чем.

— *Но есть же реальные случаи, когда колонку нужно промыть от веществ, оставшихся в колонке после проведения изократического разделения?*

— А это уже недостатки методики, которую плохо разработали. В обращенно-фазовой хроматографии для подобных разделений можно предусмотреть автоматическую промывку колонки более сильной подвижной фазой, с последующим кондиционированием применяемой подвижной фазой. Все программируется на втором насосе, как будто это градиентное элюирование.

— *То есть для промывки нужно использовать подвижную фазу с большим содержанием ацетонитрила?*

— Да. Но если применяемая подвижная фаза содержит соли, то лучше промывать колонку просто смесью ацетонитрила и воды — во избежание выпадения соли в осадок. При этом ацетонитрила берут на 20–30 % больше, чем в применяемой подвижной фазе.

Вообще, если концентрация солевого буфера достаточно высока, то сначала лучше промыть колонку смесью ацетонитрил-вода 1:9

в воде для удаления соли. И только затем применять промывочную смесь с высоким содержанием ацетонитрила.

И не забудьте, что после промывки колонку необходимо заново откондиционировать.

Одним словом, на эти промывки, по-моему, тратят слишком большое количество рабочего времени...

— А можно как-то сократить время, затрачиваемое на промывки?

— Если колонка используется непрерывно, то ее нецелесообразно промывать. Жидкостную систему прибора промывать от солей в конце дня — надо, а колонку — совершенно необязательно. Ее же потом нужно опять кондиционировать, а это — опять время.

— *Но промывки продлевают срок жизни колонки!*

— Недоказанное утверждение. Смотря, в каких условиях. При экстремальных рН подвижной фазы — скорее всего, да, несколько продлят. Но тут уже надо смотреть какая цель стоит — нормально работать, или в ущерб нормальной работе беречь колонку.

Вот если колонку оставляют без работы на продолжительное время (хотя бы на выходные), то обращенно-фазовую колонку можно промыть. Раз в неделю. Но не в случае ион-парных разделений, разумеется.

— *На многих предприятиях начальная и конечная промывка колонок (start wash, end wash) является обязательной процедурой. Выходит, что это неверно?*

— Если такую процедуру предписано проводить каждый день, для колонок всех применяемых типов и без учета агрессивности применяемых подвижных фаз — то, безусловно, это неразумно. Бездумный подход здесь крайне нежелателен.

Но промывать колонки можно, если это обращенно-фазовые колонки на силикагельной основе, с неполярной прививкой типа С8 или С18, а также неполярным энд-кеппингом. Для таких колонок правильная

промывка безопасна, а их повторное кондиционирование не занимает много времени.

— Какие предосторожности необходимо соблюдать при промывке колонок?

— Вы будете смеяться над главной рекомендацией.

— *Это уже интересно.*

— Надо быть сытым, и заниматься этим в спокойной обстановке. То есть, в идеале, после обеда.

Большая часть колонок было убито мной в голодном и нервном состоянии, когда все валится из рук. В таком состоянии очень просто перепутать банки с растворителем или подвижной фазой. Особенно если работа ведется очень быстро.

— *Ценный совет. А чего не следует делать в частности?*

— Не следует промывать колонку теми растворителями, с которыми она не совместима. Любые обращенно-фазовые колонки — и на основе силикагеля, и полимерные — не совместимы с любыми углеводородными и хлорорганическими растворителями. Самые неполярные подвижные фазы для обращенно-фазовых колонок — это смеси ацетонитрил-ТГФ 1:1, ацетонитрил-дихлорметан 80:20. Несколько более устойчивы к неполярным растворителям C8 и C30 фазы, на них можно работать на подвижных фазах с более высоким содержанием ТГФ — но это уже экзотика.

И еще очень важный совет для тех, кто любит промывать обращенно-фазовые колонки чистым изопропанолом. Делайте это только путем промежуточного перехода на чистый ацетонитрил. То есть, не следует промывать колонку сразу чистым изопропанолом, если она заполнена смесью растворителей с долей воды, а тем более — чистой водой. Это может привести к дестабилизации упаковки адсорбента и уменьшению ее эффективности. Сначала вымойте из колонки соли (например, смесью ацетонитрил-вода 9:1), затем заполните ее чистым ацетонитрилом — и лишь затем аккуратно чистым изопропанолом.

После промывки изопропанолом первым делом опять перезаполните колонку ацетонитрилом.

— В чем следует хранить обращенно-фазовые колонки?

— В принципе, их можно хранить в той же смеси ацетонитрил-вода 1:9, которая применяется для ее промывки. Но для длительного хранения лучше применять смесь ацетонитрил-вода 1:1.

Есть еще один способ консервации обращенно-фазовых колонок — в изопропаноле. Для полимерных обращенных фаз этот способ лучше не применять, то есть использовать его только для фаз на основе силикагеля. В этом случае колонка промывается последовательно смесью ацетонитрил-вода 1:9 и ацетонитрилом, и лишь заполненную ацетонитрилом колонку аккуратно перезаполняют изопропанолом на небольшой объемной скорости.

— От чего обращенно-фазовые колонки выходят из строя?

— От того же, что и все ВЭЖХ колонки. Напомню, что в общем случае колонки выходят из строя по трем причинам: неправильной эксплуатации пользователем, наличия скрытых дефектов в упаковке колонки, а также по естественным причинам, то есть в результате постепенного износа.

Среди причин неправильной эксплуатации обращенно-фазовых колонок лидирует засорение фрита (входного фильтра) колонки. Засорение происходит либо механическими загрязнениями, присутствующими в пробе, либо при выпадении в осадок на фрите неполярных компонентов матрицы образца, нерастворимых в применяемой подвижной фазе.

— Что можно сделать в этом случае?

— Кроме очевидной рекомендации готовить хорошие пробы для ВЭЖХ?

— Да.

— Достаточно установить перед колонкой ин-лайн фильтр или предколонку. Засорится картридж ин-лайн фильтра, или фрит предколонки — но фрит самой колонки останется в порядке. И колонка также останется цела.

— *А номер два по популярности?*

— Обращенно-фазовую колонку можно убить вводом пробы, которая содержит сильно гидрофобные соединения в значительных количествах: тяжелые углеводороды, жиры (экстракты минеральных масел, продуктов питания), а также белки (неочищенные биологические пробы). Еще один способ — пропустить через колонку зацветший водный буфер, в котором полно водорослей.

Во всех таких случаях колонку бывает очень тяжело регенерировать, почти невозможно.

Полимерные обращенно-фазовые колонки часто убивают по неосторожности, работая на давлении, которое значительно превышает предельное для них 150 бар. Либо не знают об этом пределе, либо забывают.

— *А как же такие факторы, как экстремальные рН, температура?*

На полимерные колонки они никак не воздействуют.

Разумный предел в 50–60 градусов для колонок на основе силикагеля, как правило, тоже соблюдают. Качественные силикагельные обращенные фазы достаточно устойчивы в области кислого рН вплоть до 2, а при аккуратной работе — даже вплоть до рН 1.

В щелочной среде силикагельные колонки быстро разрушаются. Существуют обращенные силикагельные фазы с полимерным эндкеппингом (когда вместо триметилхлорсилана применяют полимеризующийся диметилдихлорсилан), которые более-менее устойчивы в щелочной среде, но я бы в любом случае не рекомендовал бы работать на них при рН более 8–9.

В щелочной среде можно работать на полимерных фазах, а также на фазах на основе окиси циркония. Но эффективность у них не очень высокая.

— *Теперь расскажите, каковы причины естественного износа обращенных фаз?*

— Полимерные обращенные фазы достаточно устойчивы. Однако, их упаковки “дышат”, то есть объем изменяется при очередной смене подвижной фазы. И, естественно, они плохо реагируют на пересыхание адсорбента. Поэтому при нечастом применении для различных задач упаковка полимерных колонок постепенно разрушается. А при постоянной работе на одной подвижной фазе они могут прожить достаточно долго.

Силикагельные колонки выходят из строя по причине постепенного растворения силикагеля в водной среде. Неподвижные фазы, изготовленные на основе качественного силикагеля с минимумом примесей, более гидролитически устойчивы.

Постепенное растворение силикагеля в колонке приводит к появлению у колонки усадки, то есть со стороны входа в колонку образуется полость. Рост этой полости приводит к постепенному падению эффективности колонки.

— *А говорят, что усадка происходит от высокого давления.*

— Это распространенный миф. Довольно опасный, кстати говоря. Приводит к тому, что работа ведется на очень низких скоростях потока, весьма не оптимальных с точки зрения производительности анализа. Так что, опасность высокого давления для силикагельных фаз преувеличена.

— *Какова средняя продолжительность жизни обращенно-фазовых колонок на основе силикагеля?*

— При правильной их эксплуатации? И при отсутствии у колонки скрытых дефектов вроде нестабильной упаковки?

— Да.

— Очень многое зависит от качества силикагеля, примененного для изготовления обращенной фазы. Для колонки 250x4.6 с 5 мкм адсорбентом, наверное, от года до нескольких лет.

— *А для адсорбентов с другим зернением частиц?*

— Как правило, длинные колонки с крупным адсорбентом живут дольше, чем короткие колонки с мелким адсорбентом. Например, колонки 100x4.6 с 3 мкм адсорбентом служат от полугода до одного-двух лет — это очень и очень приблизительная оценка.

— Как продлить срок службы обращенно-фазовых колонок?

— Все достаточно просто: необходимо соблюдать условия их правильной эксплуатации.

Не роняйте их на пол, на стол. Храните, тщательно закрыв колонку заглушками в обеих сторон. После солевого буфера не заполняйте колонку органическими растворителями сразу — только после промывки смесью ацетонитрил-вода 1:9.

Не инжектируйте мутные пробы. Если пробы мутные — приобретите настольную центрифугу. Обойдется значительно дешевле новых колонок.

В случае сомнений в качестве очистки пробы — проверяйте перед инжектированием растворимость компонентов матрицы пробы в подвижной фазе. Например, так: смешайте в вialsе немного подвижной фазы и каплю пробы. Если проба очищена достаточно, раствор останется прозрачным, ни эмульсии, ни осадка не выпадет.

Применяйте предколонки или ин-лайн фильтры для защиты основной колонки.

Избегайте частых промывок, особенно с применением изопропанола.

Во время нагрева в термостате не устанавливайте сразу рабочую скорость. Начинайте с небольшой, дайте колонке прогреться. Также не охлаждайте колонку резко, при включенном потоке.

— Можно ли регенерировать обращенно-фазовые колонки?

— По своему опыту могу судить, что разговоры о регенерации колонок ведутся в трех случаях. Случай первый: колонка долго работала, у нее образовалась усадка, и она потеряла эффективность. Здесь уже ничего не поделаешь, колонка просто состарилась по естественным причинам.

Во-вторых, колонку или ее фрит можно чем-то сильно загрязнить. Мне кажется, что регенерация колонки здесь возможна только в одном случае — если на колонку или фрит выпала в осадок соль из применяемого буфера. Такое иногда случается. Например, работали на подвижной фазе с высокой концентрацией соли, а потом, не промывая колонку, заполнили ее чистой органикой (например, ацетонитрилом). Неприятно, но поправимо. Надо всего лишь подольше промыть колонку теплой водой.

— *А если колонку загрязнили белками, липидами?*

— Маловероятно, что колонку получится регенерировать, если ее действительно сильно загрязнили. Конечно, колонку можно долго промывать смесями ацетонитрила с ТГФ, или изопропанолом, или еще как-то. Но я бы вот что сказал — не тратьте свое время и реагенты зря, просто ради очистки своей совести. Смиритесь с потерей колонки, и больше так колонки не загрязняйте.

— *А третий случай?*

— Самый, кстати, интересный. Когда абсолютно ничего с колонкой не произошло, она в полном порядке. Просто у пользователя что-то не получилось с разделением. Например, не получается провести трансфер методики. Пользователь впадает в панику, и на этой волне ищет достаточно парадоксальные причины неудачи. Например, в том, что нечто случилось с колонкой, и ее необходимо спасти, то есть регенерировать.

— *Что делать в этом случае?*

— Следовать простому правилу. Если возникли подозрения насчет колонки, то необходимо сразу же провести ее тестирование. Возможно, после чаепития — чтобы снять состояние аффекта.

Если тест колонки нормальный — то дело не в колонке, а в чем-то еще.

— Можно ли работать на “перевернутых” колонках?

— Пожалуй, самый простой вопрос. Да, когда колонка вышла из строя по причине образование усадки...

— *То есть из-за старости?*

— Да, из-за старости. Тогда ее можно перевернуть и дорабатывать уже на перевернутой. Можно протянуть так даже месяц — если повезет.

— *А как, кстати, понять, что у колонки усадка?*

— Проведите тест колонки в прямом направлении и в обратном. Если в прямом направлении колонка не проходит тест (как правило, ни по эффективности, ни по симметрии), а в обратном — проходит, то у колонки именно усадка.

Курс 2. Работа с буферными растворами в ВЭЖХ

— Что такое буферный раствор? Как он работает?

— Буферный раствор, или на сленге просто “буфер”, это раствор соли, которая проявляет свойства и кислоты, и основания. При добавлении кислоты буфер начинает проявлять свойства основания — и нейтрализует введенную кислоту. При добавлении основания происходит аналогичный процесс.

В результате, кислотность, или рН, буферного раствора трудно изменить путем добавления небольших количеств кислоты или основания. Также рН буфера оказывается достаточно стабильным при его разбавлении, но тоже в определенных рамках, то есть все это работает не до бесконечности. Способность буфера сопротивляться внешним воздействиям и сохранять показатель кислотности (рН) неизменным называется буферной емкостью.

— Что это означает на практике?

— Например, можно приготовить навески соли для буфера не очень точно — и, тем не менее, успешно воспроизвести разделение. Или взять соль из разных банок: новой и совсем старой, которая долго стояла на воздухе и нахваталась влаги — и все равно все воспроизвести.

— Отлично! Следующий вопрос такой: зачем нужны различные виды буферных растворов?

— Диапазон, где емкость буфера максимальна (то есть область рН, где буфер действует эффективно), довольно узок, и определяется

типом аниона и/или катиона применяемой соли. Работает простое правило: $pH = pK_a \pm 1$, где pK_a — константа диссоциации иона, который обеспечивает буферную емкость.

То есть, для работы в различных диапазонах pH нужны различные буферирующие ионы с различным pK_a — что совершенно логично.

— *Пример, пожалуйста.*

— Вот фосфорная кислота — она трехосновная, то есть диссоциирует по трем ступеням. Первый протон отщепляется настолько легко, что он может сделать это даже в кислой среде ($pK_a(1) = 2.15$), то есть буферная емкость максимальна при pH от 1.15 до 3.15. Чтобы приготовить такой буфер, необходимо в раствор однозамещенного фосфата добавить фосфорной кислоты.

Второй протон отщепляется труднее, он может сделать это только в нейтральной среде ($pK_a(2) = 7.20$), то есть буферная емкость максимальна при pH от 6.20 до 8.20. Для приготовления, например, можно использовать смесь одно- и двузамещенного фосфата.

Наконец, третий протон отщепляется тяжело, для этого необходима сильнощелочная среда ($pK_a(3) = 12.32$), то есть буферная емкость максимальна при pH от 11.32 до 13.32. Чтобы приготовить такой буфер, необходимо в раствор двузамещенного фосфата добавить щелочи.

— *С какой целью буферные растворы применяют в ВЭЖХ?*

— Буферы нужны лишь в том случае, когда среди целевых соединений есть соединения с ионизирующимися (ионогенными) группами: кислоты, основания, цвиттер-ионы. Если все разделяемые соединения нейтральные, то большого смысла в применении буфера нет.

Но при разделении ионных соединений, причем в любом режиме ВЭЖХ, применение буфера желательно. С оговорками, с поправками на ограниченную совместимость с некоторыми детекторами — но желательно.

Как уже было сказано, буферы необходимы для стабилизации рН, что, в свою очередь, необходимо для стабилизации удерживания и селективности разделения ионных соединений.

В подвижных фазах, обогащенных ацетонитрилом (например, в гидрофильной HILIC хроматографии), кислотность подвижной фазы можно вообще регулировать напрямую варьированием концентрации буфера. Например, в подвижных фазах ацетонитрил-буфер 80:20 концентрация однозамещенного фосфата аммония, или формиата аммония, порядка 20 мМ в буфере соответствует более кислой среде, а 0–5 мМ — более “щелочной”.

— *Таким образом, регулирование и стабилизация рН — это единственные цели применения буферов в ВЭЖХ?*

— Нет. Буфер еще может работать просто как раствор соли. В обращенно-фазовом режиме соль повышает удерживание, что применяется для увеличения удерживания гидрофильных веществ, например, органических фруктовых кислот. В ионной хроматографии соль понижает удерживание, что используют для элюирования соединений с высоким зарядом.

Наконец, вот еще одна важная функция солевого раствора: в обращенно-фазовой ВЭЖХ добавление неорганических солей в подвижную фазу подавляет уширение хроматографических пиков соединений, склонных к хелатным взаимодействиям с адсорбентом. А именно такие соединения, напомню, часто встречаются среди фармацевтиков.

— *Каковы недостатки применения буферов?*

— Буфер — это, прежде всего, солевой раствор, а соль приводит к ускоренному износу узлов хроматографа и колонки. Соответственно, без необходимости, бездумно — не стоит добавлять в подвижную фазу соль в больших концентрациях.

Кроме того, некоторые детекторы вообще ограниченно совместимы с солевыми буферами: масс-селективный, испарительный детектор светорассеяния. Но это совершенно отдельная тема. Давайте договоримся,

что здесь речь пойдет о ВЭЖХ системах со “стандартными” детекторами: УФ/Вид, флуорометрическом, рефрактометрическом — которые, с некоторыми оговорками, совместимы со всеми типами буферов.

— *Хорошо. Итак, как подбирают концентрацию буфера?*

— Основное правило: соль не должна выпадать в осадок из подвижной фазы ни при каких обстоятельствах. То, что она не выпадает из нее в бутылки, еще не означает, что она не выпадет где-либо в жидкостной системе, например, в клапанах насоса.

— *Как обезопасить себя от выпадения солей в узлах прибора?*

— Для начала, для приготовления буферов желательно использовать те соли, растворимость которых выше. Например, вместо фосфатов калия использовать фосфаты аммония.

Основная же рекомендация состоит в том, чтобы убавлять концентрацию соли в буфере при увеличении доли ацетонитрила в подвижной фазе. Например, для фосфатного буфера я бы рекомендовал, чтобы концентрация не была более 50–60 мМ при доле ацетонитрила менее 50 %. При 80 % ацетонитрила концентрация фосфата в буфере не должна превышать 20 мМ.

Ну и, конечно, если используете буфер, то в конце рабочего дня промывайте жидкостную систему прибора горячей дистиллированной водой, предварительно отсоединив колонку (на ее место можно установить обычный толстый капилляр с двумя муфтами).

— *Какой буфер лучше применять — фосфатный или ацетатный (формиатный)?*

— Для УФ детектора лучше фосфатный буфер, потому что он прозрачен в ультрафиолете. Для детекторов вроде масс-селективного и испарительного детектора светорассеяния допустимо применение только летучих буферов, например, на основе формиата аммония.

Можно применять буферы на основе карбоновых кислот (ацетатный, формиатный, трифторацетатный) и с УФ детектором, но только если

применяемая длина волны более 220–230 нм. Работать с органическими буферами на короткой длине волны вроде 210 нм нежелательно даже в изократическом режиме.

И, тем более, ошибкой является применять органические буферы и кислоты (муравьиная, трифторуксусная) кислоты в сочетании с УФ детектором на коротких длинах волн менее 220–230 нм, если элюирование градиентное.

— *Потому что они поглощают УФ излучение, в результате чего на хроматограмме наблюдается дрейф базовой линии?*

— Не только дрейф. Градиентное элюирование, как правило, проводят в обращенно-фазовой хроматографии, а органические соли прекрасно адсорбируются неподвижной фазой. Градиентное элюирование запускает целый каскад возмущений адсорбционного равновесия, а поглощение органической солью УФ излучения приводит к их визуализации, то есть в результате мы видим все проявления возмущений адсорбционного равновесия на хроматограмме в виде: дрейфа базовой линии, резких ее “провалов” и “горбов”, системных пиков, отрицательных пиков, биений.

— Лучше использовать соли натрия или калия? Зачем иногда применяют смесь солей натрия и калия?

— Как я уже говорил, лучше применять соли аммония, они лучше растворимы.

А насчет смеси фосфатов натрия и калия — да, я тоже иногда такое видел. Однако, я не понимаю зачем это делается. Это совершенно непостижимо и, по-видимому, не имеет смысла.

— Для приготовления фосфатного буфера нередко применяют смесь однозамещенного и двузамещенного фосфата. Зачем?

— Хороший способ точно приготовить буфер со слабокислым, нейтральным или слабощелочным рН. Например, для получения нейтрального рН надо смешать растворы кислого и среднего фосфатов в отношении примерно десять к одному.

Я часто пользуюсь этим способом при разработке приложений в ионной и гидрофильной хроматографии. В обращенной фазе предпочитаю не “играть” с тонкой доводкой разделения путем варьирования рН около нейтрального — считаю такие решения недостаточно робастными.

— *А не проще ли приготовить буфер из одной соли, а до нужного рН довести его кислотой (щелочью)?*

— Нет, не проще. Смесь солей, что самое важное, обеспечивает точность приготовления буфера заданной ионной силы. Вы смешиваете 50 мМ раствор кислой соли и 50 мМ раствор средней соли в любой пропорции — и в любом случае получаете 50 мМ буфер. А вот если 50 мМ буфер средней соли доводить до нужного рН кислотой, то итоговая концентрация соли окажется выше 50 мМ.

Кроме того, готовить буфер из двух солей и проще, и быстрее. Для этого лишь нужно сделать две навески вместо одной. А доводить до рН — это долгая трудоемкая процедура.

— *А если в методике уже прописано доведение до рН кислотой?*

— Посмотрите в первый раз — сколько кислоты уходит на доведение до нужного рН, и впредь просто дозируйте в буфер известный объем кислоты. Ну а то, что реальная концентрация буфера будет выше указанной — тут уже ничего не поделаешь.

— *Ясно. Имеет ли смысл рассчитывать состав буфера с заданным рН по формуле?*

— К чему такие сложности? В свободном доступе существуют диаграммы, по которым можно сразу узнать, какие навески солей нужно взять, чтобы получить буфер нужного рН и ионной силы. Например, диаграмма для фосфатного буфера приведена в классическом справочнике “Спутник химика” Гордона и Форда, который лежит в электронном виде в интернете.

Кроме того, такая задача может возникнуть только у разработчика методики. Но тогда я не очень понимаю, зачем с большой точностью

знать рН наперед. Если полученное разделение устраивает разработчика, он просто записывает рН примененного буфера — вот и все.

— Ну, с этим понятно. А зачем в фосфатный буфер добавляют хлорид натрия?

— Этот прием чаще всего применяют в ионной хроматографии, чтобы элюировать соединения со значительным зарядом, поскольку в ионной хроматографии соль уменьшает удерживание. В случае градиентного элюирования буфер с солью ставят как вторую, сильную ступень градиента.

Гораздо реже градиент соли применяют в особом варианте обращенно-фазовой хроматографии, который называется гидрофобной хроматографией (HIC); в этом случае буфер с солью ставят как первую, слабую ступень градиента, поскольку в обращенно-фазовом режиме соль увеличивает удерживание. Однако, HIC редко применяется как аналитическая техника, чаще всего она используется для очистки белков.

— Но 100 мМ раствор хлорида натрия, да еще и с фосфатным буфером — это же плохо для прибора?

— Разумеется, очень плохо. Даже при постоянных промывках, как правило, не удастся избежать частых замен клапанов насоса, а то и ремонта головок. Да и колонки долго не живут в таких агрессивных средах.

— Можно ли избежать добавления хлорида натрия?

— В случае ионной хроматографии — безусловно, можно. Применение буфера значительной ионной силы вызвано здесь тем, что применяемая колонка обладает слишком высокой емкостью, то есть слишком высоким удерживанием.

Для того чтобы элюирование шло в мягких условиях, то есть с применением менее концентрированных солевых буферов, необходимо взять колонку с меньшей емкостью. Или вообще перейти с сильного ионита (SCX, SAX) на слабый (WCX, WAX) — но тогда придется, скорее

всего, также скорректировать рН буфера. Зато при работе на слабом ионите добавка хлорида натрия точно не понадобится.

— Каков смысл применения перхлоратов?

— Их растворы не обладают никакой буферной емкостью. Другими словами, раствор перхлората — это просто раствор неорганической соли. Как правило, перхлораты применяют в обращено-фазовой хроматографии для подавления уширения пиков азотистых оснований. В УФ диапазоне они совершенно прозрачны, в смесях ацетонитрила с водой перхлорат лития растворяется отлично, и поэтому для приготовления подвижной фазы можно применять даже 100 мМ растворы.

Но чистые перхлораты довольно дороги, поэтому применяются нечасто. Я, например, в своей работе их не применяю.

— Можно ли считать буфером раствор триэтиламина, или какой-либо ион-парной добавки?

— Насчет ион-парных добавок — скорее всего, нет. Концентрация ион-парных добавок слишком мала. Поэтому раствор ион-парной добавки, как правило, готовят в растворе буфера с необходимым рН. Фосфатный буфер здесь подходит идеально, поскольку сохраняет буферную емкость в довольно широком интервале рН.

Раствор же триэтиламина (допустим, полупроцентный) обладает мощной буферной емкостью в интересном для хроматографиста интервале рН, если раствор триэтиламина довести до необходимого рН фосфорной кислотой. Фактически, это будет фосфатный буфер на основе фосфата триэтиламмония.

Но добавки модификаторов в подвижную фазу — это также отдельная тема.

— *Надеюсь, мы ее затронем?*

— Обязательно затронем в дальнейшем.

Курс 3. Состав подвижных фаз в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Особенности ион-парной обращенно-фазовой хроматографии

— Зачем (для приготовления подвижной фазы) применяют смесь ацетонитрила и метанола?

— Это все равно, что спросить — а зачем вообще применяют метанол.

— *Метанол настолько плохой растворитель?*

— Метанол — совершенно невыгодный для обращенно-фазовой ВЭЖХ растворитель. Его смеси с водой обладают высокой вязкостью, раза в полтора-два большей, чем смеси ацетонитрила с водой, что приводит к пропорциональному росту давления (при прочих равных условиях). Чтобы справиться с избыточным давлением, либо снижают скорость потока (в этом случае анализ длится нерационально долго), либо переходят на насосы сверхвысокого давления (более дорогие сами по себе, и более дорогие в эксплуатации).

— *Тогда зачем вообще нужен метанол?*

— Обращенно-фазовый режим — он довольно негибкий, и для нейтральных соединений изменить селективность разделения (то есть разделить критическую пару пиков на той же колонке при том же удерживании) путем изменения подвижной фазы бывает крайне сложно. Углеводороды, например, совершенно невозможно.

Но если разделяемые соединения содержат много гидроксильных, фенольных, амидных групп (например, полифенолы и их гликозиды),

то можно попробовать это сделать, заменив часть ацетонитрила на метанол (метанола придется взять немного больше, так как в ОФ режиме его элюирующая сила ниже).

Если в результате такой замены селективность действительно улучшается — дальше появляются два варианта: либо этот эффект связан с изменением (модифицированием) самого адсорбента (это решение будет неробастным), либо с изменением сольватации самого анализа (это решение будет приемлемым).

Воспроизведите хроматограмму без добавки метанола (то есть ту, где разделения нет). Далее начинайте работать на подвижной фазе с добавкой метанола, отслеживая разделение критической пары. Если конечное разделение устанавливается сразу, и с течением времени не меняется, то решение приемлемо (причина изменения селективности — в изменившейся сольватации). Если разделение устанавливается не сразу, к примеру, за час-два и более, то решение неробастно (причина изменения селективности — в изменившейся поверхности).

— *Такой вроде бы простой вопрос — и такой непростой ответ!*

— Зато правдивый.

— *Хорошо. А зачем (для приготовления подвижной фазы) применяют смеси ацетонитрила и ТГФ?*

— Чтобы увеличить элюирующую силу подвижной фазы. К примеру, для элюирования сильно гидрофобных соединений: каротиноидов, жирорастворимых витаминов, триглицеридов, жирных кислот. Только вместо С18 фазы берут либо С30, либо С8.

ТГФ прозрачен от 215 нм, и поэтому очень удобен для применения в случае спектрофотометрического детектирования (в отличие от ацетона).

— *А какие у ТГФ есть недостатки?*

— Для начала, ТГФ также является достаточно вязким растворителем, в особенности в смесях с водой.

Кроме того, ТГФ очень хорошо растворяет полимеры, поэтому подвижные фазы с его добавкой совместимы только со стальными капиллярами, то есть РЕЕК капилляры применять нельзя. Работать надо очень аккуратно, следить, чтобы брызги подвижной фазы не попадали на пластиковые части прибора.

Еще многим людям не нравится запах ТГФ. Ну и на кожу этот растворитель проливать не стоит — это очень неприятно.

Возможно, по всем этим причинам стараются не работать на смесях ТГФ с водой, а делать небольшие добавки ТГФ в смеси ацетонитрил-вода.

— Имеет ли смысл добавки (в подвижную фазу) бутанола?

— Добавки бутанола, изоамилового спирта — это рецепт для увеличения стабильности мицелл в водной среде. К хроматографии они имеют отношение только в связи с тем, что достаточно давно и ограниченно применяли такой вариант ВЭЖХ — мицеллярную ВЭЖХ. Сейчас ее не применяют, поэтому в таких добавках смысла нет. Ну, сами посудите, какой громадный рост давления они дают в смеси с водой!

Если бутанол решили добавить с целью улучшения селективности разделения, то лучше вместо бутанола добавить метанол — об этом мы уже беседовали. Но мне кажется, что идею добавки бутанола позаимствовали из древней статьи по мицеллярной хроматографии.

— Зачем в подвижную фазу добавляют триэтиламин?

— Это еще один древний рецепт. Раньше силикагель делали достаточно “грязным”, он содержал большие количества примесей металлов, в том числе переходных, склонных к хелатированию. Сделать С18 фазу из такого силикагеля — не проблема. Проблема в другом: азотсодержащие основания на таком адсорбенте элюируются в виде очень широких и очень несимметричных, “хвостатых” пиков, а то и вовсе не элюируются. А азотсодержащие основания — это, наверное, большая часть фармацевтиков.

Чтобы пики этих соединений были узкими и симметричными, нежелательные взаимодействия с примесями металлов следует

подавлять. Например, добавками триэтиламина, который закрывает “грязную” поверхность силикагеля адсорбционным слоем. То есть триэтиламин — это динамический модификатор.

Как правило, к подвижной фазе добавляют от 0.5 % до 1 % по объему триэтиламина, и pH доводят до нейтрального или кислого, к примеру, фосфорной кислотой.

— *Вообще, рецепт выглядит простым и разумным. Почему он “древний”, он больше не применяется?*

— Честно говоря, не такой уж он на самом деле и древний, я применял его даже в начале 2000-х, то есть всего лет двадцать назад. Он стал не нужен, поскольку появились действительно хорошие неподвижные фазы, синтезированные на основе очень чистого силикагеля.

Это не значит, что не очень качественные фазы, выполненные на не очень чистом силикагеле, ушли в прошлое. Плохие старые фазы сейчас также продаются наравне с хорошими современными. Но на качестве недопустимо экономить — надо работать на современных, качественных колонках.

— *Почему бы не работать на старых колонках, добавляя в подвижную фазу триэтиламин?*

— Потому что этот подход имеет свои недостатки. Для начала, добавки триэтиламина, на практике, оказываются ограниченно совместимыми с УФ детектированием на коротких длинах волн — хроматограммы изобилуют системными пиками различной природы. Помню, была в старом выпуске *J. Chromat.* А восьмидесятых годов целое исследование, посвященное системным пикам, возникающим из-за добавки триэтиламина. Ну и совершенно ужасная картина получается при работе в градиенте.

К тому же, не очень это удобно — работать с триэтиламином. Это амин, у него неприятный запах. Он быстро желтеет, окисляется — а перегонять его тоже не очень приятно. Уходит его на приготовление подвижной фазы довольно много, что накладно.

А главное — в сложном случае он все равно не спасет. Вещество с действительно мощной хелатирующей способностью все равно пробьет слой триэтиламина и доберется до металлических примесей на поверхности силикагеля, и его пик все равно будет асимметричным. Так что — работайте только на качественных колонках, только на высокочистых силикагелях.

— *Хорошо, убедили. Продолжим тему модифицирования в обращенно-фазовой хроматографии. Как работают добавки ион-парных реагентов?*

— Ион-парные реагенты для обращенно-фазового режима — это, по сути, ионогенные поверхностно-активные вещества, то есть они состоят из гидрофобного углеводородного фрагмента и заряженной полярной группы. Заряд функциональной группы может быть как положительным, так и отрицательным.

Ион-парный реагент добавляют в водную часть подвижной фазы, то есть в буфер. В процессе кондиционирования колонки ион-парный реагент частично адсорбируется неподвижной фазой, в обращенно-фазовом режиме — по причине наличия в нем гидрофобного фрагмента, который выполняет роль “якоря”. Устанавливается некоторое адсорбционное равновесие.

Поскольку в ион-парном реагенте есть заряженная группа, то адсорбент приобретает заряд, то есть становится ионитом — ионообменной неподвижной фазой. В то же время, он сохраняет способность работать в обращенно-фазовом режиме. Правда, удерживание по обращенно-фазовому механизму несколько уменьшается, поскольку гидрофобность обращенной фазы снижается из-за модифицирования ион-парным реагентом.

— *Получается смесь двух механизмов удерживания?*

— Да, такие режимы называются смешанными, в данном случае получается смешанный обращенно-фазовый/ионный режим. На такой неподвижной фазе удерживаются и гидрофобные вещества (по обращенно-фазовому механизму), и заряженные (по ионному механизму), и, разумеется, гидрофобные и заряженные.

— Какие ион-парные реагенты наиболее популярны?

— Для того, чтобы придать обращенной фазе положительный заряд (соответственно, способность удерживать анионы), как правило, применяют тетрабутиламмоний, чаще всего его гидросульфатную соль — гидросульфат прозрачен в УФ диапазоне и не сильно влияет на pH буфера. Для придания свойств слабого анионита иногда применяют дециламин.

Спектр реагентов для придания отрицательного заряда (для удерживания катионов) более широк. Самые популярные — это алкилсульфонаты, с длиной цепочки от пяти метиленовых групп (пентан сульфонат) до десяти (декан сульфонат). Самым “тяжелым” реагентом является додецилсульфат. Для придания свойств слабого катионита применяют фторированные карбоновые кислоты, например, гептафтормасляную кислоту, или даже “обычную” трифторуксусную.

— В каких случаях применяют добавки ион-парных реагентов?

— В двух случаях. Случай первый, когда обращенно-фазовое разделение в целом хорошее, но какая-то пара не разделилась, причем неразделенные соединения отличаются по заряду (или одно соединение заряжено, а другое нет). Другими словами, когда ион-парный режим применяют для тонкой настройки селективности смеси незаряженных и заряженных соединений. В этом случае применяют “легкие” реагенты, например, пентан сульфонат.

Случай второй, когда разделяемая смесь состоит из гидрофобных соединений, которые хорошо удерживаются на обращенной фазе, и гидрофильных заряженных соединений, которые не удерживаются совсем. Здесь нужны более “тяжелые” реагенты, которые обеспечивают большой заряд адсорбента, например, децилсульфонат. То есть в данном случае ион-парный режим применяют для увеличения удерживания.

— *Реагенты с большим гидрофобным радикалом обеспечивают большой заряд? Как это?*

— Чем гидрофобнее реагент, тем больше его адсорбируется на гидрофобной поверхности, и тем больший заряд приобретает обращенно-фазовый адсорбент.

— *Логично. Теперь перейдем к проблемам. Основная претензия к ион-парным разделениям состоит в том, что они плохо воспроизводятся. Можно ли с этим как-то бороться?*

— Да, можно. Невоспроизводимость ион-парных разделений, по моим наблюдениям, обусловлена в основном человеческим фактором. Причем значительную долю ошибок допускают разработчики методик. С любым типом динамического модифицирования нужно уметь работать, это не так просто как может показаться.

— *Давайте начнем с основных ошибок, которые допускают при воспроизведении ион-парных разделений.*

— Этих ошибок как минимум четыре. Первая: недостаточное кондиционирование свежей колонки подвижной фазой с ион-парной добавкой. Модифицирование “легким” реагентом может идти несколько часов, а “тяжелым” — несколько дней.

— *То есть надо проявить выдержку и терпение?*

— Да. В эту же группу ошибок можно отнести судорожное изменение условий ион-парного разделения в попытке его улучшить. Надо помнить, что после каждого изменения необходимо ждать каждый раз несколько часов (дней).

— *Звучит уже пугающе. И это только первая ошибка. Что дальше?*

— Вторая ошибка: промывка колонки. Колонку с модификатором нельзя ни промывать, ни высушивать. Она всегда должна быть заполнена подвижной фазой.

Третья: бутль с подвижной фазой должна быть закрыта герметично, без щелей. Испарение даже мизерной доли ацетонитрила может привести к изменению селективности разделения.

Наконец, четвертая, и самая серьезная причина: выбор колонки с иной массовой долей углерода, то есть гидрофобностью, по сравнению с той, которая была применена разработчиком. Но тут уже вина разработчика, если он не указал массовую долю углерода примененной обращенной фазы.

— А разработчики какие ошибки допускают?

— Те же. И еще много других. Например, применяют ион-парные добавки с полимерными колонками. Или проводят градиентное элюирование в ион-парном режиме.

— А вообще, совместимы ли ион-парные разделения и градиентное элюирование?

— Очень ограниченно. В исключительных случаях можно сделать небольшой градиент с “легким” реагентом, вроде пентан сульфоната, или тетраметиламмония. Перепад доли ацетонитрила должен быть как можно меньше. При УФ детектировании длина волны должна быть по возможности больше.

Есть еще одна хитрость. Перед проведением анализа необходимо несколько раз провести градиентное элюирование вхолостую. При этом в принципе неравновесные условия начинают хоть как-то воспроизводиться.

А вообще, по-моему, градиент в ион-парном режиме — это абсурд. Это значит, что условия разделения подобраны неоптимально. Условия разделения необходимо скорректировать — увеличить долю ионного режима и уменьшить долю обращенно-фазового.

— Хорошо. Вот еще одна проблема ион-парных разделений — затраты на дорогой чистый ион-парный реагент. Как можно удешевить ион-парное разделение?

— Сделать так, чтобы минимальная добавка реагента оказывала максимальное действие. Надвзять сильно гидрофобную неподвижную фазу, например, C18 с повышенной долей углерода (то есть 20–25 %). Или мой любимый вариант — C30 фазу. Далее, надо взять наиболее “тяжелый” ион-парный реагент, например, декан сульфонат. В этом случае бывает достаточно концентрации реагента всего 0.2 мМ. Но необходимо помнить, что и скорость модифицирования в этом случае будет низкой, то есть на кондиционирование уйдет примерно дня три.

— *Сколько же сложностей... Все-таки, насколько применение ион-парного режима вообще оправдано?*

— По-моему, этот подход несколько переоценен. Многие задачи, для которых ион-парные разделения применяют совершенно бездумно, можно решить с применением ионного или гидрофильного (HILIC) режимов, без применения хитрых модификаторов.

Да, для разделения смеси гидрофобных нейтральных и гидрофильных заряженных соединений ион-парная обращенно-фазовая хроматография, бесспорно, полезна. Но постепенное внедрение смешанных обращенно-фазовых/ионообменных фаз приводит к тому, что необходимость ион-парных режимов становится все менее очевидной.

— *Так в чем же дело, почему ион-парные разделения все еще широко применяют?*

— Причина бюрократическая: огромное количество ион-парных разделений имеют официальный статус методик, большая часть их находится в фармакопеях, а фармацевтика — очень консервативная отрасль. И люди даже понимают, что методики морально устарели, а сделать ничего не могут.

Причина хроматографическая: применение ион-парных добавок позволяет тонко настраивать отношение вкладов обращенно-фазового и ионного механизмов, соответственно, тонко настраивать селективность разделения. Конкретная же неподвижная фаза со смешанной прививкой предлагает лишь некоторую фиксированную генеральную селективность. Для разработки, таким образом, нужно иметь несколько таких фаз с разным отношением двух механизмов. Но производители пока не успевают обеспечить достойный ассортимент смешанных неподвижных фаз.

— *На финал у нас осталась еще одна интересная тема. Как подбирают температуру разделения в обращенно-фазовом режиме?*

— Повышение температуры — это всегда неспроста, оно всегда чем-то вызвано. Так что давайте сначала озвучим стандартные

температурные условия: примерно на пять градусов выше комнатной температуры, то есть 30 градусов Цельсия. Если нет необходимости, всегда работайте при этой температуре — это поможет избежать многих проблем.

Повышение температуры оказывает значительный эффект на удерживание и даже на селективность разделения в обращенно-фазовом режиме. Удерживание уменьшается, причем довольно резко. Исключения могут представлять гидрофильные соединения при работе на 100 % водных подвижных фазах: там определенное влияние могут оказать процессы десольватации.

Селективность разделения гидрофобных нейтральных соединений не изменяется, зато она может измениться для гидрофильных, в том числе заряженных, соединений. Здесь могут играть роль различные эффекты: десольватации, изменения степени диссоциации и т.д. Большого смысла детально разбираться в этом нет. Поскольку предсказать такие изменения затруднительно, все они нежелательны, поскольку уменьшают робастность методики.

И совсем грубой ошибкой является тонкая настройка температуры при градиентном элюировании. Такие “волшебные” разделения никто никогда не воспроизведет. Как-то раз я видел очень красивое разделение в градиентном режиме при странной температуре — 36 градусов. Это значит, что для достижения разделения авторам приходилось менять температуру с шагом в один градус. То есть на валидацию этого разделения даже не стоит тратить время — оно нестабильно.

— Но есть случаи, когда повышение температуры целесообразно?

— Я знаю один случай, когда работа на повышенных температурах неизбежна, и несколько случаев, когда допустима. Напомню, речь идет только об обращенно-фазовой хроматографии.

— Когда повышение температуры действительно необходимо?

— В том случае, когда целевое соединение существует в виде таутомеров, и их превращение друг в друга затруднено. Хроматографический пик такого соединения может быть расщепленным.

В этом случае температуру разделения можно увеличить. При работе на силикагельной колонке — максимум до 60 градусов.

Вообще, таутомерия целевых соединений — это довольно редкий случай. Мне таутомерный анализ последний раз встречался несколько лет назад. Это был такролимус — макролидный антибиотик, молекула которого обладает кольчато-цепочечной таутомерией.

— *Когда повышение температуры допустимо?*

— Например, в хиральной хроматографии. В данном случае — при работе в обращенно-фазовом режиме. В хиральной хроматографии задача проста — разделить энантиомеры любыми способами. И если повышение температуры приводит к разделению — то почему бы это не использовать. Только надо помнить о температурных ограничениях для применяемой колонки.

— *А как же случаи повышения температуры для снижения давления?*

— То есть в итоге — для ускорения разделения путем снижения вязкости водно-органической подвижной фазы. Ну, можно так делать, да. Правда, я как разработчик не особенно это одобряю. Невыгодно это. Можно снизить давление процентов на 20, то есть ускорить разделение на те же 20%. Ценой укороченной жизни колонки. И все равно выигрыша во времени сильного не получится — надо же будет каждый раз ждать, пока колонка тщательно прогреется, откондиционируется.

Имеет, правда, смысл повышать температуру при работе на полимерных колонках. В случае применения полимерных адсорбентов температура ускоряет массообмен достаточно эффективно. То есть, при повышении температуры эффективность разделения на полимерных колонках возрастает — что ценно, учитывая, что она изначально не бывает очень высокой.

А вот при работе на изначально очень эффективной колонке (как правило, на основе силикагеля), вполне может оказаться, что работа на повышенной температуре приведет к снижению эффективности. Даже форма пика может ухудшиться, например, может появиться передняя асимметрия.

— С чем это связано?

— С неполным прогревом колонки. Этот эффект усиливается на колонках большого диаметра и при применении значительной объемной скорости потока.

— Но 30 градусов — это не проблема?

— Нет. Проблемы могут начаться на 50–60 градусах. Тогда нужно озаботиться покупкой хорошего теплообменника перед входом колонки. Для прогрева подвижной фазы.

— Понятно. Кстати, при повышении температуры в обращенно-фазовом режиме удерживание уменьшается, следовательно, необходимо корректировать состав подвижной фазы, уменьшать долю ацетонитрила?

— При разработке разделений при повышенной температуре не надо допускать одной очень простой ошибки — сначала разрабатывать разделение при комнатной температуре, а потом ее повышать, параллельно корректируя уже подобранные условия. Если знаете, что будете повышать температуру — разрабатывайте разделение при повышенной температуре сразу, с самого начала.

— *Напоследок провокационный вопрос: если повышение температуры не так уж и выгодно, то зачем нужна высокотемпературная хроматография?*

— Точнее, обращенно-фазовая высокотемпературная хроматография.

— *Это настолько принципиально — что она обращенно-фазовая?*

— Конечно. Идея заключается в том, что при высокой температуре поверхностное натяжение воды падает, что в случае обращенно-фазового режима эквивалентно добавлению к воде органического растворителя, например, ацетонитрила. То есть, при работе на высокой температуре требуется меньше ацетонитрила (о чем мы только что говорили).

— То есть это экологическая идея, идея “зеленой химии”?

— Совершенно верно. Но, по моему мнению, она не очень хорошая. Причем я могу привести не только хроматографические аргументы, но и экономические.

— Например?

— Расход огромных объемов растворителя происходит, в основном, при работе крупных лабораторий на плохих, неоптимальных методиках. Причем значительная часть растворителей уходит не на хроматографические разделения, а на приготовление растворов веществ, на экстракцию, пробоподготовку.

Так что здесь надо работать, в первую очередь, над экологическими стандартами качества хроматографических методик и экологическими стандартами качества работы лабораторий. А повышение температуры горю не поможет.

Курс 4. Вопросы, наиболее часто задаваемые специалисту по методической поддержке

— Отчего времена удерживания нестабильны? Как бороться с нестабильностью времен удерживания?

— Существует большое количество причин нестабильности времени удерживания. Несколько типичных причин я, конечно же, приведу. Однако значительно важнее в этом вопросе понять общий принцип поиска причины нестабильности. Он таков: сначала отрабатываются наиболее простые гипотезы, и только затем — более сложные.

— *И какие же гипотезы самые простые?*

— Сначала следует исключить технические причины. Внимательно осмотрите жидкостную систему на предмет течей.

Если течей нет, следующим шагом проверьте работу насоса. Возьмите мерный цилиндр, секундомер. Включите насос (на применяемой скорости потока) и одновременно запустите секундомер; собирайте элюат из применяемой колонки в мерный цилиндр. Если, допустим, при скорости потока 1 мл/мин за 20 минут в цилиндр набирается 20 мл элюата, то насос работает корректно.

— *Что после технических причин?*

— Далее следует удостовериться в постоянстве состава подвижной фазы. Проверьте — насколько герметична крышка на бутылки с подвижной фазой (и есть ли она вообще). Нередко в специальных крышках делают отверстия для трубок забора подвижной фазы,

и между трубкой и стенкой отверстия остаются зазоры — избавьтесь от них.

Удостоверьтесь, что растворители отбираются из одних и тех же банок. Удостоверьтесь, что подвижные фазы смешивает один человек, одним и тем же способом. Проверьте точность отбора растворителей для приготовления подвижной фазы. Если есть сомнения по поводу точности отбора объемов растворителей мерным цилиндром, можете перейти на отбор определенного объема по массе, то есть использовать для измерения объема аналитические весы — которые всегда точнее, чем человеческий глаз.

Если для приготовления подвижной фазы применяется буфер, рН которого доводится до необходимого значения кислотой или щелочью — проверьте, насколько повторяемы объемы добавляемых реагентов. Помните, что с точки зрения воспроизводимости разделения всегда лучше добавлять фиксированное количество реагента, а не ориентироваться на показания рН-метра.

— *Довольно много нюансов.*

— Когда эти знания становятся навыком, о соблюдении всех условий даже не задумываешься. А навыком при постоянной работе они становятся быстро.

— *Это вселяет надежду. Что идет следующим пунктом?*

— Далее проверьте постоянство температуры колонки. Это особенно важно в случае проведения разделений в обращено-фазовом режиме, где удерживание сильно зависит от температуры.

Если колонка установлена в качественном, изолированном от внешней среды термостате (как правило, воздушном), удостоверьтесь, что температура термостата минимум на пять градусов выше, чем максимальная температура комнаты за день. Обычно минимальная температура термостата составляет 30 градусов, исходя из средней комнатной температуры 25 градусов. Однако в некондиционируемом помещении температура может подниматься и выше 25 градусов.

— *А если термостата нет?*

— Если колонка установлена в простом контактном термостате, не изолированном от внешней среды, или вообще без термостата — убедитесь, что поблизости от прибора не находится мощных нагревающих (печи, сушильные шкафы, газовые хроматографы), или охлаждающих (окна с форточками, кондиционеры) устройств.

Вот теперь наиболее простые гипотезы можете считать проверенными.

— *Их достаточно много.*

— Зато их можно быстро и без труда проверить. Даже если не в них дело, то совсем не лишне еще раз проверить насколько правильно организована работа с прибором.

— *Дальше начинаются причины химические?*

— Да. И это сложнее. Первая рекомендация в таком случае — не паниковать. Не делать каких-то судорожных движений. Надо, наоборот, успокоиться и понаблюдать за происходящим. Установить, смещаются ли все пики на хроматограмме единообразно и пропорционально (на какой-то определенный процент), или же происходит перемещение пиков относительно друг друга.

Первый случай — селективность разделения не изменяется, или изменяется незначительно. Удерживание может либо увеличиваться, либо уменьшаться. А второй случай — селективность разделения изменяется значительно; здесь удерживание каких-то соединений увеличивается, а каких-то уменьшается.

— *С какого случая начнем?*

— Проще со второго. Если селективность в процессе работы изменяется, и колонка новая — с большой долей вероятности причиной нестабильного удерживания является незавершенное кондиционирование колонки.

Напомню, что если проводится ион-парное разделение, то кондиционирование колонки может занимать до двух-трех дней, и промывать колонку в процессе работы недопустимо.

Для разделения в гидрофильном (HPLC) режиме и ионных разделений на силикагельных ионных фазах также требуется достаточно продолжительное кондиционирование колонки. При этом до кондиционирования колонку желательно дополнительно обводнить путем ее промывания смесью ацетонитрил-вода 1:1.

Кстати, если удерживание без видимых внешних причин растет — то тоже, вероятно, по причине незавершенного процесса кондиционирования.

— *А если удерживание уменьшается?*

В обращено-фазовой хроматографии такое случается при работе на подвижных фазах, содержащих мало органического растворителя, менее 5–10 %. Эффект называется — потеря смачиваемости, или (на английском) деветтинг.

— *Это, кажется, называется “фазовый коллапс”...*

— Теперь говорят — “потеря смачиваемости”. Напомню, как это происходит. При работающем насосе все работает как надо, удерживание и разделение есть. Насос останавливают; через некоторое время запускают вновь. И видят, что удерживание всех соединений резко упало, а вместе с удерживанием исчезло и разрешение.

Объясняется этот эффект тем, что интенсивно энд-кеппированная обращенная фаза становится настолько неполярной, что перестает смачиваться водной подвижной фазой. Которая при отсутствии давления в системе, просто вытесняется из пор адсорбента — и колонка перестает работать.

— *Как бороться с фазовым коллапсом?*

— С потерей смачиваемости. Лучше с ней не бороться, а решать задачу не в обращено-фазовом режиме, а в каком-либо другом,

например, гидрофильном (HILIC). Однако если это невозможно, то надо искать хорошую обращенную фазу, которая обладает и хорошим удерживанием полярных соединений, и высокой устойчивостью к потере смачиваемости.

— *А что же делать с колонкой, пострадавшей от потери смачиваемости?*

— От одного раза она не умрет. Аккуратно промойте ее сначала водой, потом смесью вода-ацетонитрил 1:1, потом чистым ацетонитрилом, потом опять смесью вода-ацетонитрил 1:1. Поможет. И больше не ставьте ее на задачи, где применяются полностью водные подвижные фазы. Эта колонка — не для таких задач. Это совсем не значит, что она плохая — просто не для таких задач.

— *Хорошо. Еще есть причины уменьшения удерживания?*

— Еще такое возможно в нормально-фазовом режиме. Причина — постепенное обводнение нормальной фазы.

— *То есть колонка постепенно набирает воду?*

— Ну, скорее, следовало бы говорить — влагу. Ее может быть не так уж и много.

Но поскольку вода в нормально-фазовой хроматографии — это самый сильный полярный модификатор поверхности силикагеля, ее постепенное накопление приводит к дезактивации полярного адсорбента и потере удерживания.

— *Откуда влага попадает в колонку?*

В первую очередь — из подвижной фазы и из проб.

Обводненность проб можно заметить довольно просто. Если инжектирование стандарта, приготовленного в хорошо осушенном растворителе, не вызывает падения удерживания, а инжектирование реальных проб — вызывает, то, скорее всего, реальные пробы содержат значительное количество влаги.

— *И что тогда делать?*

— Лучше сушить пробы. Можно, например, безводным сульфатом натрия при небольшом нагревании. Но, естественно, проба должна остаться при этом представительной, то есть не должно быть потерь целевых соединений при сушке.

А колонку надо сушить аккуратным промыванием чистым изопропанолом на небольшой скорости. Можно также при небольшом нагревании (до 50–60 градусов), и лучше подольше. Потом промыть хорошо осушенным гексаном при комнатной температуре.

— *А если вода попадает из подвижной фазы?*

— Надо понять из какого растворителя. Поэтому-то в нормально-фазовой хроматографии любят растворители, в которых влаги не очень много: гексан, изопропанол, ледяную уксусную кислоту. Но применяют же еще много других.

— *И когда будет понимание, в каком растворителе влага — следует взять более качественный?*

— Действовать по обстановке. Взять более качественный, или осушить и перегнать некачественный, или вообще заменить растворитель на другой.

Наконец, существует универсальный метод борьбы с нестабильностью удерживания в нормально-фазовой хроматографии — применение полярного модификатора.

— *Что это означает на практике?*

— Применяйте в качестве добавки уксусную кислоту. Добавляйте ее хотя бы в количестве одного процента, если это возможно. А лучше — двух. То есть, допустим, подвижная фаза — это 2 % изопропанола в гексане. Поменяйте лучше 2 % изопропанола на 2 % уксусной кислоты. Удерживание обязательно стабилизируется.

— *Тему нестабильности времен удерживания можно считать на этом закрытой?*

— Еще один комментарий. Существуют просто по своей природе нестабильные хроматографические системы, которые дают неробастные разделения. Например, представьте, что при обращено-фазовом разделении рН подвижной фазы зафиксировали в районе pK_a целевых соединений. Да еще и не применяли при этом буфер. О какой стабильности времен удерживания здесь вообще может идти речь?

— *А что делать в таких случаях?*

— Не бояться повторно тестировать методику на робастность. Если все предосторожности, перечисленные в этой беседе, соблюдены — то, скорее всего, причиной отсутствия стабильности удерживания является неудачная методика.

— *Что делать, если площадь пика не воспроизводится?*

— Здесь с большим отрывом лидируют неточное взвешивание, растворение и тому подобные вещи.

То есть, вроде бы, все очень банально. Однако точно взвешивать — это, вообще говоря, очень непросто, и даже требует некоторого таланта. У кого-то не хватает терпения, у кого-то руки дрожат. Так что точно взвешивать — не каждому дано.

Кроме того, бывают же вещества, которые тяжело взвешивать, например, гигроскопичные, или же в виде очень мелких кристаллов, которые при любом неосторожном движении, как пыль, взлетают в воздух.

— *А как взвешивать правильно?*

— Сначала нужно подобрать себе по руке шпатель, лучше стальной. Я предпочитаю шпатель в виде очень маленькой ложечки с длинной ручкой — таким очень удобно отбирать сухие вещества из виал, пенициллинок. Очень часто взвешивают на бумажках, а это не лучший вариант — я предпочитаю тонкую фольгу.

Все надо делать аккуратно. Сколько раз я видел, когда бумажку с навеской кое-как заталкивают в мерную колбу, растворяют навеску,

а дальше пытаются подручными средствами достать размокшую бумажку из мерной колбы!

— *А как правильно?*

— На мерную колбу установить маленькую воронку. Навеску аккуратно перенести в колбу через воронку. Три раза смыть фольгу от остатков навески в колбу. Потом трижды промыть воронку — тоже в колбу.

— *Хорошо, дальше.*

— Со взвешиванием все, переходим опять к невоспроизводимости площади пика. Стандартные вещества могут быть от разных производителей. Разного качества. За этим также нужно следить.

— *А некачественные стандарты часто встречаются?*

— Не часто, но, все же, встречаются. Бывает, например, что исследуемая субстанция чище, чем применяемый стандарт.

— *Хорошо, идем дальше.*

— Если площадь пика уменьшается, то логично проверить — не деградирует ли (распадается) изучаемое вещество в пробе.

— *Это же очевидно.*

— Тем не менее, встречается такое нередко.

Если площадь пика увеличивается или уменьшается на некоторое более-менее фиксированное значение, то причиной может быть системный пик, или вообще какой-либо пик под пиком целевого вещества. Чтобы это установить, необходимо провести холостое инжектирование, например, подвижной фазы, или лучше — растворителя пробы, но без растворенной пробы (такой вид холостого инжектирования называется реагент-бланк).

Вообще, при правильной работе эту ошибку сделать невозможно, поскольку градуировка начинается с проведения холостого инжектирования.

— *На этом список очевидных ошибок заканчивается?*

— Есть еще один казус, когда сетуют на невозпроизводимость площади пика при различных скоростях потока.

Разумеется, площадь пика не зависит от скорости потока только для потоковых детекторов (например, масс-селективного), а для концентрационных детекторов (например, оптических детекторов) площадь пика обратно пропорциональна скорости потока.

— *Идем дальше.*

— Очень распространены две не то чтобы очевидные, но достаточно простые ошибки — пытаются интегрировать пик (то есть определять его площадь) на фоне дрейфа базовой линии, или на фоне слишком высокого шума.

— *Какой дрейф приемлем?*

— В идеале, на фоне пика дрейф должен быть вообще незаметен, то есть базовая линия — если по оси Y установить масштаб, равный высоте пика — должна выглядеть прямой, без наклона.

— *А шум?*

— Опять же, в идеале отношение сигнал/шум должно быть больше или равно ста ($S/N \geq 100$), то есть высота пика должна быть в 50 раз больше, чем размах шумов. Например, для отлично настроенного УФ детектора шум может составлять величину порядка 0.02 mV, то есть влияние шума на точность определения площади пика будет пренебрежимо малым (в этом случае) при высоте пика 1 mV или более.

— *А может ли прибор быть причиной невозпроизводимости площади пика?*

— Конечно, может. Просто я хотел подчеркнуть, что человеческий фактор в этом вопросе является более распространенной причиной, чем неполадки с прибором.

Даже если причиной невоспроизводимости является неточное инжектирование пробы, то это тоже человеческий фактор — если инжектирование ручное.

— *А как правильно инжектировать пробу при ручном инжектировании?*

— При количественном анализе не следует применять частичное заполнение петли (когда объем инжектирования меньше объема установленной петли). Заполнение петли должно быть полным.

Шприц необходимо брать такого объема, который превосходит объем петли в несколько раз. Например, при объеме петли 10 мкл лучше пользоваться 50 мкл шприцем. Объем отбираемой в шприц пробы должен быть в 3–4 раза больше, чем объем петли. Пузырьки под штоком выгонять не обязательно.

Аккуратно введите иглу шприца в инжектор, и плавным движением пропустите через инжектор 2–3 объема пробы. При этом пузырьки воздуха под штоком не должны попадать в инжектор.

Хорошо, если на сливе инжектора стоит тонкий тефлоновый капилляр — в этом случае слив излишка пробы можно контролировать визуально. Если видны излишки пробы, значит, петля инжектора наверняка заполнена.

Кстати, шприц нужно вводить в инжектор до упора — иначе петля не заполнится. Признаком заполнившейся петли, опять же, является наличие слива излишков пробы.

— *А если инжектирование автоматическое, при помощи автосамплера?*

— В любом случае, при количественном анализе автосамплер необходимо периодически проверять. Для этого существует стандартная процедура. Если автосамплер работает в режиме неполного заполнения петли, то да, он может работать не очень корректно. Особенно если на нем установлен шприц на 100 мкл, а инжектируемый объем составляет, к примеру, 1 мкл. Если допустимая погрешность превышает

установленные для этого оборудования нормы, то следует обратиться за помощью к сервис-инженеру.

Кстати, если площадь пика уменьшается более-менее равномерно с течением некоторого достаточно продолжительного времени (особенно на фоне увеличения шумов) — дело может быть в падении чувствительности применяемого детектора. В этом случае детектор необходимо проверить при помощи стандартных тестов на чувствительность.

У оптических детекторов основной причиной падения чувствительности является вышедшая из строя лампа.

И вот еще последний совет для тех, кто увлекается ион-парными разделениями.

— *Он касается воспроизводимости площади пика?*

— Да. При работе с ион-парными разделениями и УФ детектированием следите за тем, чтобы pH пробы был таким же, что и pH подвижной фазы. Невыполнение этого условия может также повлечь невоспроизводимость площадей пиков.

— *Вот еще два очень типичных вопроса пользователей по работе с прибором. Почему у меня на хроматограмме есть “лишние” пики, которых не должно быть? Как бороться с “лишними” пиками на хроматограмме?*

— Если пики слишком широкие, и они не воспроизводятся при повторном инжектировании — это просто пики, которые остались от предыдущих анализов.

В случае обращено-фазового разделения колонку всегда можно промыть подвижной фазой с более высокой элюирующей силой. В иных адсорбционных режимах промывку надо применять с осторожностью, помня, что после нее колонку нужно заново кондиционировать.

— *То есть просто промыть колонку применяемой подвижной фазой может оказаться быстрее, чем промыть ее более сильной подвижной фазой, а затем откондиционировать?*

— Если разделение не обращенно-фазовое, то с применяемой подвижной фазы лучше не уходить.

— *Хорошо. Теперь, что если это не пики с предыдущих инъектирований?*

— Если сигналы воспроизводятся при повторном инъектировании, то тогда они действительно обусловлены текущим инъектированием. Существует миф, что в этом случае колонку также необходимо промывать. Это очень опасное заблуждение, которое в пределе может привести к выходу колонки из строя по причине беспорядочных промывок.

Надо запомнить, что если сигналы на хроматограмме воспроизводятся, то причина — не в колонке. Если сигнал узкий и воспроизводимый, то он не может быть обусловлен веществом, которое “застряло” в колонке. Если бы оно “застряло”, то никак не элюировалось бы в виде узкого воспроизводимого пика. Это надо уложить в голове.

— *Какие гипотезы нужно рассматривать в случае воспроизводимых сигналов?*

— При изократическом элюировании существуют три основных варианта. Либо это системные пики. Либо в пробе появились новые вещества. Либо загрязнены элементы жидкостной системы, расположенные от инжектора до входа в колонку.

При градиентном элюировании добавляется еще одна возможность. Если растворители, применяемые для смешивания подвижной фазы, недостаточно чистые, то контаминанты (загрязняющие вещества) в подвижной фазе слабой ступени сначала концентрируются на колонке, а потом элюируются в виде пиков на хроматограмме.

Но градиентное элюирование мы обсудим отдельно. Здесь сосредоточим внимание на первых трех причинах.

— *С какой удобнее всего начать?*

— С загрязнения элементов жидкостной системы. Это самая распространенная причина появления “лишних” пиков.

— *Что это за элементы?*

— Сам инжектор, включая шприц. Любые дополнительные устройства, стоящие между инжектором и колонкой. И входной фрит (фильтр) на самой колонке.

— *Как проверить эти элементы на наличие загрязнений?*

— Чаще всего загрязняются инжектор и шприц. Чтобы проверить так ли это, необходимо всегда иметь запасной чистый ручной инжектор и новый запасной аналитический шприц.

— *А если их нет?*

— Ну, новый шприц — это не проблема. Лучше его купить, если нет. Он дешевый, и лишним запасной шприц точно не будет. А в качестве проверочного можно использовать инжектор другого хроматографа — если он есть, этот второй хроматограф. Вообще, при покупке хроматографа всегда в комплекте не мешает приобретать запасной ручной инжектор, даже если (а может даже — тем более) этот хроматограф оснащен автосамплером.

Наконец, и шприц, и инжектор можно помыть.

— *Как это делается?*

— Если разделение проводится методом обращено-фазовой хроматографии, то лучший растворитель для промывки и того, и другого — доведенная до кипения вода. Из шприца вынимают шток; обе части шприца обрабатывают в горячей воде ультразвуком. Шток и иглу вытирают сухой чистой салфеткой. Шприц собирают, а затем еще несколько раз промывают его горячей водой возвратно-поступательными движениями штока.

Для промывки ручного инжектора необходимо иметь специальную насадку под наконечник люер (то есть наконечник обычного медицинского шприца). Такая насадка бывает либо стальной и копирует иглу аналитического шприца с тупым концом (такой насадкой пользоваться удобнее, и она универсальная), либо тефлоновой

с уплотнением под ручные инжекторы с инъекционным портом с лица прибора, в центре крана (таким дизайном обладают современные версии кранов Rheodyne).

Медицинским пластиковым шприцем на 20 мл отбирают горячую воду, устанавливают насадку — и, переключив кран в положение LOAD, промывают инжектор (под слив лучше подставить какую-либо емкость). Такую процедуру можно повторить несколько раз.

— *А вообще чем обычно загрязняется инжектор?*

— Есть разные варианты. Очень быстро инжектор загрязняется при работе с легко окисляющимися соединениями. Особенно если при окислении они осмоляются. Например, такое бывает при работе с фенолами, ароматическими аминами. Обратите внимание — в этом случае шприц и его шток быстро покрываются черной вязкой смолой.

При работе с сахарами, белками, “био” образцами, фосфатным буфером при нейтральном pH — инжектор, если его периодически не промывать, даже может зарости плесенью. Такое случается при небрежной работе, когда кран инжектора скрыт от глаз оператора: установлен внутри термостата, или автосамплера.

Стандартная причина загрязнения стальных элементов инжектора при работе с белками, пептидами, а также низкомолекулярными фармацевтическими соединениями, обладающими хелатирующими свойствами — адгезия (закрепление) подобных веществ на металлических поверхностях.

— *За счет комплексообразования?*

— Точно. В этом случае инжектор и шприц необходимо промывать не просто подвижной фазой или горячей водой, а дополнительно раствором кислоты, например, соляной, азотной.

— *Столько сложностей?*

— В тяжелых случаях надо уходить от применения инжекторов с металлическими деталями. Давайте обсудим потом это отдельно.

— Хорошо. Мы перечислили все возможные причины загрязнения инжектора?

— Нет, конечно. В общем случае, загрязнение инжектора и шприца компонентами пробы происходит всегда, когда эти вещества имеют невысокую растворимость в применяемой неподвижной фазе и, при этом, высокую адгезию к металлу.

Например, в нормально-фазовом режиме всегда проблематично работать с любыми ароматическими соединениями при применении подвижных фаз на основе гексана. Особенно неприятно работать, собственно, с ПАУ (полиароматическими углеводородами). Промывать инжектор и шприц гексаном в этом случае совершенно бесперспективно. Нужно промывать его, например, хлороорганикой. Можно толуолом или ацетоном, но они токсичнее.

— В целом, все ясно. Это мы рассмотрели причины появления “лишних” пиков, обусловленных...

— Загрязнением узлов жидкостной системы, расположенных от инжектора до входа в колонку. Теперь нужно разобраться со случаем, когда в пробе появляются новые вещества.

Диагностировать такой случай очень просто. Достаточно провести холостой анализ, только инжестировать лучше не подвижную фазу, а растворитель пробы — только без пробы. И, конечно, инжестировать необходимо новым чистым шприцем.

— Это и называется реагент-бланк?

— Да. Кстати, повторите холостой опыт несколько раз, до воспроизводимости.

Все “лишние” пики, которые появятся на хроматограмме бланка — это будут либо системные пики, либо пики от загрязнения узлов от инжектора до входа колонки.

Потом сравните хроматограмму бланка и рабочую хроматограмму. Все пики на рабочей хроматограмме, которые не встречаются

на хроматограмме реагент-бланка, обусловлены соединениями, присутствующими в инжектируемой пробе.

— *Откуда они берутся?*

— Секрета здесь никакого нет. Это, как правило, продукты деградации компонентов пробы.

Если же картина совершенно стабильна при различных воздействиях на исследуемую пробу, то, скорее всего, исследуемая субстанция просто содержит примеси. Как правило, этот факт вызывает удивление при анализе раствора стандартного образца. Что ж, иногда встречаются и некачественные стандартные образцы.

— *Теперь расскажите о системных пиках.*

— Существует два типа системных пиков. “Настоящие” системные пики, или иные системные сигналы, появляются на хроматограмме в том случае, когда детектор реагирует на возмущение адсорбционного равновесия в хроматографической системе.

Поэтому системные пики не редкость при проведении ион-парных разделений, а также вообщем в случаях применения систем с динамическим модифицированием. Но если значительных адсорбционных равновесий в системе нет, и/или применяемый детектор к ним нечувствителен — никаких системных пиков не наблюдают.

— *Бывают и “ненастоящие” системные пики?*

— Причиной появления “лишних” сигналов на хроматограмме также может являться элюирование компонентов растворителя, применяемого для приготовления пробы. Строго говоря, это не системные пики, а пики растворителя.

— *Приведите какой-нибудь пример появления сигнала от растворителя.*

— В обращено-фазовом режиме при анализе этанольных экстрактов с УФ детектированием, этанол (который не поглощает УФ

излучение) проявляется на хроматограмме в виде симметричного двойного сигнала вверх и вниз. Отлично видны УФ детектором ацетон, ДМСО и ДМФА...

— А какие детекторы генерируют больше всего системных пиков?

— К компонентам растворителя, как и к возмущениям адсорбционного равновесия, чувствителен рефрактометрический детектор, а также УФ детектор при работе на коротких длинах волн поглощения.

— Как бороться с системными пиками?

— Если условия детектирования изменить нельзя?

— Да, если мы однозначно ограничены рефрактометрическим детектированием, либо УФ детектированием на короткой длине волны. И ничего изменить нельзя. Например, в целевом веществе нет хороших хромофоров.

— Или нет больше никакого другого детектора — как чаще бывает.

— Да.

— Вариантов так не так уж и много. Если речь идет о компонентах растворителя, то можно поменять растворитель. Или изменить селективность разделения таким образом, чтобы компоненты растворителя отделились от целевых соединений.

А с “настоящими” системными пиками ничего толком не сделаешь. Можно их минимизировать, если применять в качестве растворителя пробы подвижную фазу. В крайнем случае, необходимо следить за тем, чтобы рН пробы совпадал с рН подвижной фазы.

— Вот еще проблема: “Не вижу пиков!”. Что делать, если ожидаемые пики не наблюдаются?

— Возможных причин отсутствия нужных пиков на хроматограмме существует много, и некоторые из них банальны, к примеру,

выключенный детектор, или перепутанные каналы. Однако, если исключить очевидные “ляпы”, то, судя по моему опыту, здесь возможны три варианта.

Первый: проба не попадает в колонку, скорее всего, по причине неправильно проведенного инжектирования. При ручном инжектировании самая распространенная ошибка — шприц вставлен в порт крана не до упора. При применении автосамплера игла шприца может не доставать до пробы в виале.

Второй: удерживание в данных условиях слишком большое, и целевые соединения просто остаются в колонке, то есть не элюируются.

Третий вариант самый курьезный. Нередко случается, что инжектируют совсем не то вещество, которое ожидают. Путают пробы, стандарты.

— *И такое случается?*

— Случается, причем не так уж и редко.

— *Хорошо. Следующий вопрос из той же категории. Что делать, если пик расщепился? В чем причина расщепления пиков?*

— Для начала надо посмотреть — все ли пики уширены и расщеплены, или только какой-либо определенный пик.

Если уширены и расщеплены все пики, причем для пиков в начале хроматограммы расщепление проявляется ярче, чем в конце — это характерная картина выхода колонки из строя. Причиной может быть как усадка, так и скрытые дефекты упаковки.

Иногда причиной расщепления может служить сильно загрязненный входной фрит. Иногда — плохо собранные жидкостные соединения, к примеру, стальной капилляр на входе в колонку обрезан неровно, или еще что-либо не менее вопиющее.

— *То есть причины технические. А если расщеплен один пик?*

— Здесь причина, в теории, чисто химическая. Некоторые вещества, например, таутомеры с замедленным превращением друг в друга, элюируются в виде расщепленного пика. И сливаются в один только при повышении температуры.

Но есть еще один казусный, но распространенный случай, когда “пик” кажется “расщепленным”.

— *Интересно, какой?*

— Когда за один пик принимают смесь пиков. А их разделение принимают за расщепление пика.

— *И часто такое случается?*

— Часто при работе на одноканальных детекторах, которые не дают никакой спектральной информации. И даже при работе на диодно-матричном УФ детекторе такое тоже встречается. Ведь плохо разделяющиеся соединения нередко являются структурно подобными, соответственно, обладающими похожими УФ спектрами. Например, изомерами.

При работе с синтетическими веществами или реакционными смесями нужно помнить про то, что синтезированные соединения снесколькимихиральнымицентрами существуют ввиде диастереомеров. Диастереомеры обладают сходными спектральными характеристиками и элюируются, как правило, недалеко друг от друга.

— *А что насчет уширения хроматографических пиков?*

— Опять же, если уширены все пики (уширение, кстати говоря, может сопровождаться и расщеплением пиков), причем для пиков в начале хроматограммы уширение проявляется ярче — то либо колонка вышла из строя, либо плохо собрана жидкостная система хроматографа.

В любом случае необходимо провести стандартный тест колонки на нейтральных соединениях и минимальной нагрузке. Если с жидкостной системой точно все в порядке...

— *Как это понять?*

— Проводят тот же стандартный тест, но только на специальной колонке, которую больше ни для каких других целей не используют. Такая колонка должна иметь очень высокую эффективность, чтобы быть чувствительной к качеству сборки жидкостной системы. Я применяю колонки с эффективностью 40 тыс.т.т., обычно 250 мм и пористым 3 мкм адсорбентом, или 150 мм поверхностно-пористые с 2.6 мкм адсорбентом.

— *Теперь вернемся обратно к тестированию колонки.*

— Так вот, если с жидкостной системой точно все в порядке, то плохой тест однозначно свидетельствует о проблеме с колонкой. В этом случае после тестирования колонки в нормальном направлении переворачивают колонку и повторяют тест. Если расщепление пиков на перевернутой колонке уменьшается, то причина уширения — в усадке колонки, если нет — то в скрытом дефекте упаковки. Про все эти явления мы поговорим в специальном разделе, посвященном качеству колонок.

— *Договорились. А если тест колонки хороший, а в рабочей ситуации уширение все же есть?*

— Здесь есть варианты. Допустим, та же ситуация: уширены все пики, для пиков в начале хроматограммы расщепление проявляется ярче, чем для пиков в конце. И это не связано с колонкой и с жидкостной системой.

Тогда причиной уширения (и даже расщепления) может быть перегрузка колонки. При перегрузе колонки основной удар на себя принимают слабо удерживаемые соединения, которые элюируются в начальной части хроматограммы. Поэтому основным признаком перегруза является уширение и, в пределе, расщепление пиков в начальной области хроматограммы, ориентировочно при $k' \leq 2$.

— *Как можно перегрузить колонку?*

— Перегрузить колонки можно либо количеством вещества, либо объемом растворителя пробы. И, конечно, и тем, и другим одновременно.

— *Давайте сначала разберемся с перегрузкой колонки количеством вещества.*

— Допустим, инжeksiруют пробу небольшого объема. Но, тем не менее, концентрация вещества в этой пробе очень высокая, и в колонку попадает большое количество (или масса, что одно и то же) вещества. Одно дело, когда колонка имеет большой объем, то есть большой диаметр и длину. И адсорбент имеет высокую емкость. Тогда такая упаковка может выдержать одновременное инжeksiрование значительного количества вещества, и пик не уширится, то есть перегруза колонки веществом не происходит.

А теперь представим, что такое же количество вещества попадает в колонку небольшого объема (то есть небольшой длины или/и небольшого диаметра).

— *Небольшая колонка не может справиться с большим количеством вещества?*

— Не может. Поэтому пик уширится и, в пределе, расщепляется. Максимальное влияние этого негативного эффекта испытывают слабо удерживаемые соединения.

— *А как обстоит дело с перегрузкой растворителем пробы?*

— Теперь представим, что в пробе содержится сравнительно небольшое количество вещества, и перегруза количеством вещества нет. Зато на этот раз инжeksiруется значительный объем пробы.

Здесь все начинает зависеть от растворителя пробы, а конкретнее, от разницы в элюирующей силе растворителя пробы и подвижной фазы.

— *Когда начинаются проблемы?*

— Когда элюирующая сила растворителя пробы становится больше, чем элюирующая сила подвижной фазы.

— *Каким образом об этом можно судить?*

— Для обращено-фазового режима это означает, что доля ацетонитрила в пробе превышает долю ацетонитрила в подвижной фазе. Получается, что после инжектирования компоненты пробы не концентрируются на адсорбенте, образуя узкую хроматографическую зону, а расплываются вдоль колонки. В результате, пики уширяются, особенно в начале хроматограммы.

Негативный эффект усиливается, если вязкость пробы и подвижной пробы сильно различаются. В обращено-фазовой хроматографии в таких случаях более вязкой чаще оказывается проба, а не подвижная фаза. Это обусловлено тем, что проба может содержать спирты: метанол, этанол, изопропанол — а также, к примеру, диметилсульфоксид.

— *Каким образом разница в вязкости пробы и подвижной фазы сказывается на форме пика?*

— При инжектировании вязкой пробы течение подвижной фазы в области входного фрита колонки становится турбулентным, и форма хроматографической зоны искажается. Соответственно, искажается и форма пиков, опять же, в большей степени тех, которые находятся в начале хроматограммы.

Если два эффекта складываются — то есть, и элюирующая сила, и вязкость пробы оказываются больше, чем у подвижной фазы — появляется значительная вероятность уширения и расщепления хроматографических пиков. Первыми под удар попадут пики в начале хроматограммы. И, скорее всего, это произойдет при работе на короткой колонке, или/и на колонке с небольшим диаметром.

— *А можно привести какие-либо примеры?*

— Недавно мне рассказывали такой случай. Работали на колонке 100x3 с 2.6 мкм обращено-фазовым поверхностно-пористым адсорбентом, в подвижной фазе было порядка 30 % ацетонитрила. Инжектировали 10 мкл пробы, в которой, помимо 30 % ацетонитрила, содержалось еще 30 % метанола.

— *То есть у пробы больше и элюирующая сила, и вязкость?*

— Точно. И 10 мкл — это слишком много для такой колонки, даже если бы она была заполнена полностью пористым адсорбентом. А здесь — поверхностно-пористым, да еще и диаметр колонки уменьшенный, то есть объем инжектирования должен составлять пару микролитров.

— *И пики уширились?*

— На совсем свежей колонке — только уширились. Но буквально через несколько дней работы уширение резко возросло, а пики в начале хроматограммы начали еще и расщепляться.

— *Почему это произошло не сразу?*

— У свежей, только что упакованной колонки нет ни малейшей усадки, да и скрытые дефекты упаковки еще не дают о себе знать. Поэтому и уширение пика по причине перегрузки колонки выглядит все еще не сильно ужасным.

Но за пару дней растворяется пыль, присутствующая в не очень качественных силикагелях, колонка приобретает совсем небольшую, возможно, усадку, и для такой маленькой колонки с такой маленькой емкостью...

— *...этого оказывается достаточно. То есть разные причины уширения и расщепления пиков могут усиливать друг друга?*

— Все верно. Как правило, пики только уширяются. А расщепляются — когда складываются сразу несколько негативных факторов.

— *А как бороться с уширением и расщеплением пиков, обусловленным перегрузом колонки?*

— Универсальный рецепт: собираешься перегружать колонку (любым способом) — бери колонку длиннее и больше диаметром. И заполненную полностью пористым адсорбентом, а не поверхностно-пористым. Это позволит решить проблему “в лоб”.

В подобных случаях я предпочитаю брать колонку 250x4.6 с полностью пористым 3.5 мкм или 3 мкм адсорбентом. Особенно

удобно на таких колонках работать, если насос позволяет работать до давления 600–800 бар — к такому стандарту постепенно подтягиваются все производители ВЭЖХ оборудования.

Ну, в самых крайних случаях при перегрузе можно соединить две 250x4.6 колонки в одну, то есть получить 500 мм колонку.

— *Но анализ на ней будет идти очень долго!*

— Неправда. На 5 мкм адсорбенте при правильно подобранном удерживании и оптимальной скорости потока — не более 20–30 минут. Небыстро, да — но не критично. Мы же говорим о вынужденной ситуации, когда мы вынуждены жертвовать производительностью (скоростью) анализа ради возможности перегрузить колонку без существенных потерь разрешения.

А есть вообще кардинальное решение проблемы — переделать методику разделения таким образом, чтобы в начальной области хроматограммы не было критических пар пиков, а лучше — чтобы там вообще не было пиков. Если удерживаемый объем будет высоким для всех соединений на хроматограмме, система будет вполне устойчива при любом перегрузе.

— *Вернемся к тесту колонки. Если тест колонки хороший, а в рабочей ситуации уширение все же есть — но дело не в перегрузе колонки?*

— Либо, как и для случая расщепления пиков, за один пик принимают несколько неразделенных пиков. Либо причина уширения химическая, что выходит за рамки траблшутинга.

— *То есть?*

— То есть надо менять марку колонки, или вообще применять какую-то другую методику разделения. Это вопрос не методической поддержки, а, скорее, вопрос трансфера (переноса) методик или их разработки.

Курс 5. Вопросы, наиболее часто задаваемые специалисту по технической поддержке. Устранение простых неполадок ВЭЖХ оборудования

— *Что делать, если не работает насосная система? Проще говоря, если “насос не качает”?*

— Причин может быть множество, и не все неполадки можно устранить своими руками. Здесь необходимо, прежде всего, уметь проводить диагностику неисправности. Чтобы понять — нужно ли вызывать сервис-инженера, или в этом нет никакой необходимости.

— *С чего следует начать?*

— Наверное, с понимания устройства плунжерного насоса.

Если открыть крышку на лицевой панели насоса, то под ней можно будет увидеть один или два металлических цилиндра, направленных основанием к наблюдателю, которые похожи на 500-граммовые стальные гирьки. Каждый такой цилиндр называется головкой насоса. Если она одна, то насос называется одноплунжерным, если две — то двухплунжерным. Внутри головки находится камера для подвижной фазы определенного объема. У аналитических головок размер камеры меньше, у препаративных головок — больше, поскольку препаративные головки должны обеспечивать значительную объемную скорость потока.

— *А где находится плунжер?*

— Если демонтировать головку насоса, то под ней можно будет видеть сапфировый стержень — это и есть плунжер насоса. Кулачковый механизм с возвратной пружиной, находящийся с внутренней стороны корпуса, толкает плунжер, в результате чего тот совершает возвратно-поступательные движения.

Снизу и сверху головки расположены две стальные гайки; это — входной (снизу) и выходной (сверху) клапаны насоса. Внутри клапан устроен очень просто; там находится сапфировое седло, то есть кольцо, на котором располагается сапфировый шарик. Когда поток идет в направлении от шарика к седлу, то шарик плотно садится в седло и, таким образом, закрывает клапан. При потоке в обратном направлении шарик отходит от седла, и клапан открывается.

— *Так как работает насос?*

— Возвратная пружина толкает плунжер внутрь, при этом входной (нижний) клапан открывается, а выходной (верхний) закрывается. В результате, камера (внутри головки) заполняется подвижной фазой. Потом кулачок толкает плунжер наружу, при этом входной (нижний) клапан закрывается, а выходной (верхний) открывается. В результате, подвижная фаза из камеры под давлением подается на выход головки.

В том случае, если насос двухплунжерный, потоки из обеих головок сходятся в специальном тройнике, который оборудован открываемым вручную вентиляем с отдельным выходом налицевую сторону. Этот вентиль называется клапаном на сброс (или сливным клапаном), и применяется для промывок жидкостной системы насоса. Выход клапана на сброс имеет наконечник люер, то есть в него можно установить обыкновенный медицинский шприц.

— *И как промывать жидкостную систему насоса?*

— Для начала нужно отметить, что насухую насос вообще не работает — его обязательно нужно заполнить жидкостью.

— *Какой?*

— По идее, любой. Но при работе на водно-органических подвижных фазах промывка и запуск насоса всегда осуществляется на дистиллированной воде.

— С чем это связано?

— С частым применением в подвижных фазах солевых буферов. При высыхании подвижной фазы на основе водного буфера соль оседает на элементах конструкции насоса. А вода как раз растворяет соли. Особенно горячая вода. Но горячей водой насос промывают, а заполнять сухой насос удобнее водой комнатной температуры, разумеется.

Для этого открывают сливной клапан, устанавливают на него медицинский шприц объемом 20 мл. Заборную линию погружают в емкость с водой. Тянут шток шприца вручную на себя; при этом, вода должна пойти вверх по заборной линии, далее через входной клапан в головку, и уже оттуда в сливной клапан и в медицинский шприц.

— Здесь у меня появилось сразу два вопроса. Первый — а что делать с одноплунжерными насосами, у которых нет клапана на сброс?

— Клапан на сброс существует и сам по себе, его можно купить и самому установить между насосом и инжектором. Если его нет, и покупка не предвидится, то медицинский шприц нужно подсоединять прямо к выходному клапану на головке. Для этого можно купить специальную насадку на шприц типа люер, которая оканчивается обычным ВЭЖХ капилляром на 1/16 дюйма с фитингом.

— Второй вопрос. Что делать, если как я не тяну на себя шток шприца, вода не хочет идти вверх по заборной линии и насос?

— Здесь есть два варианта. Сначала снимите со входа заборной линии пористый (металлический или тефлоновый) фильтр подвижной фазы.

— Это который лежит на дне емкости с подвижной фазой?

— Да. Только сейчас там вода. Так вот, если без фильтра вода пошла, то причина неисправности — в засоренном фильтре. Просто поменяйте

его на новый, или попытайтесь регенерировать старый, “прокипятив” его подольше в дистиллированной воде.

Если вода не пошла даже без фильтра, то такая ситуация называется “залипли клапана”. В этом случае заполнять насос нужно следующим образом. Наберите в шприц воды, соедините его через переходник со входным клапаном насоса и с усилием продавите воду через головку насоса. Вода должна вылиться через выходной (верхний) клапан.

— *Что делать, когда насос заполнен?*

— Можно не торопиться, а прокачать через него побольше воды, лучше горячей. Надо дать возможность солям на элементах насоса раствориться.

Затем следует проверить работоспособность насоса.

— *Как?*

— Тут нам пригодятся два простых теста. Вот первый.

Сначала не соединяйте насос с инжектором и колонкой. Возьмите мерный цилиндр, секундомер. Включите насос (на применяемой скорости потока) и одновременно запустите секундомер; собирайте вытекающую из насоса воду в мерный цилиндр. Если, допустим, при скорости потока 1 мл/мин за 20 минут в цилиндр набирается 20 мл элюата — то без нагрузки (и давления) насос работает корректно.

Далее проделайте все эти манипуляции, предварительно подсоединив насос к инжектору и установив колонку. Я обычно беру нерабочую колонку, которая используется только как нагрузка при проверке насоса, например, 50x4.6 с 1.8 мкм адсорбентом. При скорости 1 мл/мин на чистой воде она дает давление примерно 120 бар. Это как раз то, что нужно, то есть больше 100 бар.

Итак, если и в этом случае при скорости потока 1 мл/мин за 20 минут в цилиндр набирается 20 мл элюата — то и с нагрузкой (под давлением) насос работает корректно.

— А вопрос состоит именно в том, что делать, если он не качает. То есть, видимо, работает некорректно.

— Либо совсем не качает, либо подает не с той скоростью, какая установлена на насосе. Это разные случаи.

— Начнем с того случая, когда вообще не качает.

— Самая курьезная причина — фитинг заборной линии не до конца (или неплотно) вкручен во входной клапан насоса. Бывает. У меня тоже иногда случается, когда постоянно работаешь с новым “железом”. В общем, проверьте герметичность заборных линий.

Ну а самая распространенная причина при рутинной работе — это засор входного клапана. И, по сути, единственная причина, которую можно устранить своими силами — если только в комплекте прибора нет запасных головок в сборе.

— А бывают такие комплекты?

— По умолчанию их никто не предложит. Пользователю при покупке прибора следует самому обеспокоиться такими вещами, как запасная головка насоса, или хотя бы — запасные входные клапаны. И много о чем еще, об этом мы поговорим в отдельной теме о закупке оборудования.

— Как засор может привести к тому, что насос перестает подавать растворитель?

— Элементарно — из-за засора на входном клапане шарик не может плотно сесть в седло. При прямом ходе плунжера клапан не закрывается до конца, и набранный в камеру головки растворитель через щель между шариком и седлом сливается обратно в емкость с растворителем (подвижной фазой).

— Это случается в том случае, когда колонка установлена, или без колонки?

— При умеренном засоре насос перестает работать при наличии нагрузки, то есть когда колонка установлена. Но без колонки работает.

Но при значительном засоре он перестает работать даже без нагрузки, то есть без колонки. Если это вообще засор, а не что-то более серьезное.

— *Что может послужить причиной засора?*

— Либо в клапан попадают механические загрязнения — что случается реже, потому что за входе заборной линии все-таки стоит фильтр.

Либо на элементах клапана оседают соли, которые добавляют в подвижную фазу — такое случается значительно чаще.

Ведь стоит “высушить” головку насоса, не промыв ее предварительно от соли, или пропустить чистый органический растворитель прямо после подвижной фазы с буфером — и засор обеспечен. Если соли в подвижной фазе достаточно много — может быть достаточно просто на некоторое время остановить поток, и соль сразу начнет оседать на элементах жидкостной системы.

— *Теперь самое важное — как устранить засор?*

— Сначала тщательно промойте насос горячей водой — либо своим ходом, либо (если совсем отказывается работать) вручную через сливной клапан.

Как только насос начинает работать самостоятельно, оставьте его промываться горячей водой хотя бы минут на 10–20.

Если это помогает — то причиной неисправности является отложение солей на клапанах. Причем случай еще не очень запущенный.

— *Что дальше?*

— Дальнейшие действия зависят от условий гарантии на прибор (или конкретно на насосный блок). Если за самостоятельное вмешательство в конструкцию прибора предусмотрено лишение гарантии — много не навоеешь.

В подобном случае я бы рекомендовал иметь в запасе целый насос в сборе. Новый ставишь в работу, старый — в ремонт. Очень сильно сэкономите на вызове сервис-инженера. Ну и не потеряете времени.

— *А если насос не на гарантии?*

— Тогда самый лучший вариант — это если в комплекте прибора есть и запасная головка, и запасные входные клапаны. И конструкция насоса позволяет легко заменять входные клапаны вручную.

— *Довольно идеализированная ситуация.*

— А должна быть, по идее, самой обычной рабочей ситуацией.

Сначала меняете входной клапан на новый. Заново заполняете всю систему водой. Если насос с новым клапаном начал работать, значит, причина неисправности — сильно засоренный входной клапан.

— *А если нет?*

— Если нет, то на новую нужно заменить всю головку. Если и с новой головкой ничего не работает, то значит — неисправность действительно серьезная, и своими силами справиться не получится.

— *А если у насоса два плунжера?*

— Да, у двухплунжерных насосов две головки, и два входных плунжера. Поэтому и объем работы — двойной. Насосы с одним плунжером ремонтируются значительно легче.

— *А как менять головку и входной клапан?*

— Их можно заменить только в том случае, когда они вообще являются съёмными.

Головка меняется достаточно просто. Для этого нужно открутить два шестигранных винта по бокам головки, предварительно отсоединив от нее заборную линию (со стороны входного клапана) и стальной выходной капилляр (со стороны выходного клапана). Аккуратно снимаете головку с плунжера, ставите новую головку, закручиваете винты.

При съеме входного клапана главное — это всегда держать его строго вертикально, не наклонять, а тем более — не переворачивать. Насколько эта рекомендация критична — определяется конструкцией клапана. В некоторых клапанах седло и шарик собраны в едином корпусе, таком бочоночке, и клапан представляет из себя стальную гайку с этим бочоночком-вставкой. Это удобная для ремонта конструкция — шарик и седло не выпадают из клапана при малейшем неосторожном движении, а для замены клапана надо всего лишь заменить вставку с седлом и шариком.

Иная конструкция клапана подразумевает его полную разборность на отдельные элементы. И в этом случае снимать клапан необходимо очень аккуратно. Малейшее неверное движение — и все детали придется долго искать на полу.

— *А что значит — снимать аккуратно?*

— Напомню, речь идет о входном клапане, то есть нижнем. Отсоедините от него заборную линию. При помощи специального ключа, или разводного ключа, сделайте первые два-три оборота, придерживая клапан другой рукой снизу. Или же — пусть кто-нибудь поможет придерживать клапан. Дальше откручивайте клапан вручную. Держа его строго вертикально, плавно перенесите и поставьте его на рабочий стол.

— *Что нужно делать с засоренными входными клапанами?*

— Опять же, держа входной клапан строго вертикально, плавно перенесите и поставьте его в ультразвуковую ванну. Заполните ее водой или 10 %-ной азотной кислотой. Добавьте несколько капель средства для мытья посуды. Выставьте температуру на максимальную (обычно это 60 градусов). Проведите обработку ультразвуком в течение часа.

Затем плавно перенесите клапаны на стол, перезаполните ультразвуковую ванну чистой дистиллированной водой и поставьте клапаны обратно в ванну. Проведите обработку ультразвуком в течение 5–10 минут без нагревания.

Установите входные клапаны на насос, и еще раз промойте его горячей водой в течение 10–20 минут.

— А что делать с неработающей головкой?

— Отдайте ее в ремонт.

— Ясно. Кстати, был обещан второй тест насоса.

— Он еще проще, чем первый. Промойте насос горячей водой. Приготовьте смесь ацетонитрил-вода 1:1 и тщательно ее продегазируйте, например, фильтрацией под вакуумом при помощи специальной колбы Бунзена (так называемая система фильтрации подвижной фазы). Заполните насос этой смесью, установите колонку, например, обращенно-фазовую, для создания давления.

Посмотрите на манометр, на его верхние и нижние показания при включенном потоке. Норма — это разница не больше 1–2 бар. Если разница составляет несколько бар, или даже больше — то что-то с насосом не вполне в порядке.

— Что, например?

— Такие скачки давления, к примеру, тоже могут быть обусловлены засором клапанов; если насос при этом подает подвижную фазу с заданной скоростью — то этот засор, или отложение солей могут быть небольшими, на начальной, так сказать, стадии. Промойте на всякий случай всю систему горячей водой — хуже точно не станет.

— Разве скачки давления не говорят всего лишь о том, что в насос попал пузырек воздуха?

— Поэтому второй тест и проводится с применением тщательно дегазированной подвижной фазы. Чтобы исключить попадание пузырьков воздуха в насос.

— А если есть дегазатор, то надо дегазировать подвижную фазу?

— Обязательно. Дегазатор — не панацея. Особенно при градиентном элюировании. Но об этом — в отдельной беседе.

— Хорошо. Перейдем к течам из узлов жидкостной системы. Почему они случаются, и как с ними бороться?

— Все сводится к одному — правильно собирать жидкостную систему.

Для начала не делать совсем уж грубых ошибок. Например, закручивать сталь в пластик. Лучше — сталь в сталь, и пластик в пластик.

— *А пластик в сталь?*

— Можно, хотя и нежелательно. На стороне высокого давления пластиковые фитинги, вкрученные в стальные муфты, будут быстро выходить из строя. И такое соединение все равно не будет до конца надежным.

— *Чего еще не надо делать?*

— Не надо думать, что все фитинги и соединения на 1/16” (дюйма), находящиеся в продаже, идеально подходят друг к другу. Немного разные, к сожалению, бывают стандарты у различных фирм.

И если есть течь, и при разумном подтягивании винтов эта течь не прекращается — то не надо звать парня с пассатижами и крепкими мускулами, чтобы он устроил нечто напоминающее холодную опрессовку изделия. А потом для надежности заматывать эту хлипкую конструкцию метрами парафильма. Это прямой путь к уничтожению дорогостоящей техники. Я не о фитинге, а о том, во что его намертво вкручивают: колонке, инжекторе, насосе — то есть к узлу, который находится на стороне высокого давления.

— *Что еще?*

— Не надо пользоваться дешевыми пластиковыми фитингами из Kel-F (они похожи на оргстекло). Сразу меняйте их как увидите. Чуть больше органики в водно-органической подвижной фазе — и они набухают, а затем при высыхании ломаются. И приходится как-то выкручивать обломки этих фитингов из колонки или насоса.

Не надо вкручивать неродные фитинги в инжекционный кран. Кран поставляется с набором стальных капилляров, винтов и — самое главное — фирменных ферул. Ими и пользуйтесь.

— А вообще как спокойно жить в этом изобилии различных стандартов? Есть какой-либо рецепт?

— Есть, но только весьма кардинальный. К сожалению, не всегда совместимый с гарантийным обслуживанием прибора фирмой-поставщиком.

— И какой же это совет, интересно?

— Сразу заменить всю фирменную нестандартную “обвеску” прибора, включая все капилляры и фитинги.

— Неожиданно! И на что?

— На стандартные стальные капилляры со внешним диаметром 1/16” (дюйма). На инжектор монтируйте их с применением оригинальных фитингов из комплекта инжектора. А иные соединения выполняйте при помощи самых дорогих и качественных фитингов. Каких именно — мы поговорим потом отдельно.

— А не слишком дорого все выйдет?

— Три-четыре фитинга? Недорого. Если надо работать, а не бороться полдня с течью.

— Следующая тема — повышенное давление в системе. Опасно ли это, и как с повышенным давлением бороться?

— Задайте сразу на насосе верхний предел давления на 50 бар ниже, чем максимальное давление на данном насосе — и давления бояться нечего. Или, в случае применения полимерных колонок, верхний предел давления нужно выставить на уровне максимального давления для данной полимерной колонки.

Все остальное — дело житейское. Если давление нарастает не постепенно, а резко, буквально за секунду-две, и упирается в верхний предел — это значит, что, скорее всего, жидкостная система где-то заблокирована.

— *А в чем может быть причина?*

— Причина может быть самой разной. Если применяют РЕЕК капилляры, то они легко пережимаются при слишком сильном затягивании фитинга.

Если для инжектирования применяют автосамплер, то игла может промахнуться мимо виалы, зацепить пластик и забиться.

Наконец, в систему может попасть какое-либо механическое загрязнение. Например, из плохо профильтрованной пробы (в этом случае наиболее вероятен засор инжектора).

Из бракованной колонки адсорбент может вытечь и застрять в капилляре к детектору, или в кювете детектора.

— *И как понять — что именно случилось?*

— Точнее сказать — где случилось. Надо по очереди соединять с насосом различные отрезки жидкостной системы, чтобы понять — где находится засор.

Сначала проверить сам насос. Потом соединить с ним инжектор. Потом установить колонку. И так далее.

В общем, действовать методом золотого сечения. Если причина, допустим, в ручном инжекторе — то придется, к сожалению, отсоединить от него все капилляры и снять петлю. Потом проверить проницаемость каждого капилляра по отдельности, петли и так далее.

— *Ясно. А если давление нарастает постепенно?*

— Значит — засора самой жидкостной системы нет. Если давление кажется слишком высоким, то снимите колонку и посмотрите давление без колонки. На водной подвижной фазе при объемной скорости 1 мл/мин давление без колонки не должно, по идее, превышать десятка-другого бар — если между колонкой и инжектором стоит стандартный капилляр с внутренним диаметром 150 мкм, а между насосом и инжектором — с внутренним диаметром 300 мкм.

Можно еще проверить датчик давления. Зафиксируйте давление без колонки. Далее установите на приборе любую новую обращенно-фазовую 250x4.6 колонку с 5 мкм адсорбентом, и пропускайте через нее смесь ацетонитрил-вода 1:9 со скоростью 1 мл/мин до стабилизации давления. Вычтите из него давление без колонки. Результат должен составлять 100–120 бар, в крайнем случае — 80–150 бар. Если это действительно так, то датчик давления, скорее всего, также исправен.

— *И тогда причина высокого давления — в колонке?*

— Ну, не высокого — а такого, какое есть.

Опять же, колонка может быть соединена с предколонкой, с ин-лайн фильтром. В этом случае всю эту систему надо разобрать на части, и “прозвонить” их по отдельности на предмет повышенного давления. Может оказаться, что причина не в колонке, а в предколонке — к примеру.

— *Ну, это понятно. Но, допустим, что дело все-таки в колонке.*

— Тогда, скорее всего, у нее засорен входной фрит. Это можно легко проверить. Измерьте давление на колонке в прямом направлении, потом переверните ее, и измерьте давление на колонке в обратном направлении. Если давление в обратном направлении ниже, чем в прямом, тогда причина повышенного давления действительно состоит в засорении входного фрита.

— *Мы уже раньше выяснили, что регенерировать колонку при загрязнении входного фрита практически невозможно?*

— Именно так. Применяйте предколонки, ин-лайн фильтры. Хорошо готовьте пробы. Если фильтрация проб не спасает — центрифугируйте.

— *Идем далее. Что делать, если капилляр выбивает из колонки?*

— Перейти на металлические капилляры. И качественные фитинги со стальным винтом и РЕЕК ферулой. И тогда — никогда и ничего не выбьет.

Если сил переоборудовать весь прибор нет, то тогда пусть будет стальным хотя бы один капилляр — от инжектора к колонке. И на него же установите один качественный фитинг. На который устанавливается колонка.

— *И это все?*

— Совершенно все. Просто забудьте про РЕЕК капилляры как про страшный сон. И про грошковые РЕЕК фитинги (которые бесплатно прикладывают к колонкам).

— *На очереди — проблемы с высоким шумом (при применении УФ детектирования).*

— Наверное, стоит начать с того, что часто за шум принимают то, что шумом не является.

— *А именно?*

— Во-первых, периодические колебания базовой линии. Во-вторых, пузыри воздуха.

— *Но мелкие пузырьки же выглядят именно как шум?*

— А я как раз говорю о достаточно крупных пузырях, которые видны глазом.

На хроматограмме они выглядят как вертикальные черточки с зашкалом — если пузыри небольшие, или как зашкаленный сигнал с вертикальными склонами — если пузырь большой.

— *Как их отслеживать?*

— Рекомендую установить на выходе из детектора прозрачный тефлоновый капилляр.

— *А откуда берутся пузыри воздуха?*

— Воздух может попадать в систему из водной подвижной фазы — если она не дегазирована. Как правило, в этом случае пузырьки воздуха можно отчетливо наблюдать в линии забора подвижной фазы.

Воздух может постепенно выходить из сухой колонки в процессе ее промывки.

Ну и, наконец, воздух может подтравливать из негерметичной кюветы детектора. В этом случае поищите течь из кюветы. И если найдете — лучше обращайтесь к сервис-инженеру, не пытайтесь что-то подкрутить сами.

— *Почему?*

— Кювету расколете — вот и все дела. Хрупкая это вещь.

— *Как бороться с пузырями?*

— Дегазировать подвижную фазу. При работе на повышенной температуре можно установить после детектора (на конце сливного капилляра) специальную деталь — противодавление. Противодавление с указанной величиной давления, создаваемого в кювете при определенной объемной скорости потока, можно приобрести у производителей расходных материалов. Нужно следить, чтобы создаваемое внутри кюветы давление не превышало предел по давлению для этой кюветы.

— *Как работает противодавление и причем здесь повышенная температура?*

— При повышенной температуре растворимость воздуха понижается, и даже при использовании дегазированных подвижных фаз остаточный воздух в виде мелких пузырьков может выделяться прямо внутри кюветы.

Противодавление создает внутри кюветы давление, которое действует в обратном направлении, то есть способствует растворению воздуха в подвижной фазе. Таким образом, образование пузырьков воздуха в кювете подавляется.

— *Теперь разберемся с периодическими колебаниями базовой линии.*

— Они обусловлены нестабильной работой насосной системы. В простом случае это обусловлено попаданием в головку насоса пузырька воздуха.

Для начала, тщательно продегазируйте подвижную фазу. Далее прокачайте ее через насос при повышенной скорости потока 5–10 мл/мин, предварительно отсоединив колонку, либо открыв сливной клапан.

— *Если это не помогает?*

— То дело, скорее всего, в засоре входного клапана насоса, или в иной его неисправности. Действуйте по схеме, которую мы обсудили в начале курса. То есть начните с промывки насоса горячей водой. Ну и далее по схеме.

— *Понятно. Теперь, если шум — это действительно шум. Что тогда?*

— Очень мелкие пузырьки выглядят именно как повышенный шум. Опять же — дегазируйте подвижную фазу. При работе на недегазированной подвижной фазе в изократическом режиме уровень шума повышается примерно на порядок. А в градиентном режиме — на два порядка. И дегазатор не спасает.

— *А что делать?*

— Не заливайте чистый буфер в одну емкость, и чистый ацетонитрил — в другую. Это не верно ни с какой стороны. Смешайте отдельно слабую и сильную подвижную фазы, тщательно их продегазируйте. И вот тогда при проведении градиентного элюирования дегазатор удалит остаточный воздух, выделяющийся при смешивании ступеней градиента. И, в итоге, шум будет в норме.

— *А если причина шума — не в отсутствии дегазирования?*

— Давайте разберем еще одну, уже не техническую, причину. Повышенный шум возникает при работе на загрязненных подвижных фазах, сильно поглощающих УФ излучение.

— *Загрязненных? Как?*

— Есть два варианта. Первый — для приготовления подвижных фаз применяют растворители и реагенты ненадлежащей чистоты. Второй — для приготовления подвижной фазы применяют растворители или реагенты, которые поглощают УФ излучение в той же области, что и целевые соединения.

— *Например?*

— Например, применяют ацетатный буфер или трифторуксусную кислоту (ТФУ) и длину волны поглощения 200–210 нм.

— *Почему при поглощении УФ излучения подвижной фазой шум повышается?*

— Потому что резко уменьшается поток света через кювету — он же поглощается самой подвижной фазой.

Представьте, что чистая (не поглощающая УФ излучение) подвижная фаза — это белый лист, а целевое вещество — черное пятно. Легко увидеть черное пятно на белом фоне, правда?

— *Да.*

— А грязная подвижная фаза — это темно-серый лист бумаги. Черное пятно на нем разглядеть труднее будет?

— *Труднее.*

— В том и дело.

— *А каким должен быть фон, чтобы повышение шума стало заметным?*

— Около 50–100 mAU (mV).

— *Ясно. Остальные причины повышенного шума — технические?*

— Да. Это либо “севшая” лампа, либо более серьезная поломка в оптической схеме или электронике детектора.

Запасную лампу всегда необходимо иметь под рукой, то есть запасная лампа всегда должна быть в комплекте закупаемого прибора. Если после замены старой лампы на новую проблема решается — значит, причина шума заключалась в “севшей” лампе. Если нет — то необходимо обращаться к сервис-инженеру.

Кстати, вот еще что. Может случиться, что шум как раз нормальный, но он воспринимается как повышенный.

— *Например?*

— Например, если установить на УФ детекторе с единственной дейтериевой (УФ) лампой длину волны менее 200 нм, или более 300–350 нм, то шум будет значительно выше, чем на длине волны 260 нм.

Потому что дейтериевая лампа в области 260 нм обладает максимальной светимостью, а ниже 200 нм и выше 350 нм она, по сути, “тухнет”, то есть дает очень мало света.

— *И шум, соответственно, повышается.*

— Конечно же. Если нужно работать в области более 300 нм, то лучше применять детектор с двумя лампами: дейтериевой и обычной вольфрамовой.

Ну, или ксеноновой лампой — но у них свой недостаток; ксеноновые лампы “тухнут” на коротких длинах волн менее 240 нм. Кстати, на диодно-матричных детекторах установлены ксеноновые лампы. Они, конечно, мощные, но все равно обеспечивают, скажем, не рекордную чувствительность на длинах волн порядка 205–210 нм.

И еще шум зависит, разумеется, от настроек детектора.

— *Каких именно?*

— Постоянной времени (time constant) и ширины спектральной щели (spectral slit width). К сожалению, далеко не на всех приборах эти

настройки можно регулировать. От ширины спектральной щели зависит поток света через кювету. Чем больше ширина щели монохроматора, тем больше света попадает в кювету, и тем ниже шумы.

Ценой увеличения светового потока является снижение спектрального разрешения. Но, с другой стороны, зачем УФ детектору высокое спектральное разрешение? Это же не спектральный прибор. Так что, я бы рекомендовал сразу выставить самое высокое значение для ширины спектральной щели, которое вообще доступно для данного детектора. Очень часто таким значением является 16 нм.

— *А что такое постоянная времени?*

— Время, в течение которого электроника детектора копит сигнал, прежде чем зафиксировать его в виде определенного значения. Чем выше постоянная времени, тем ниже шум.

Шумы снижаются пропорционально квадратному корню из постоянной времени. То есть, если увеличить ее значение в 4 раза, то шум уменьшится в 2 раза, а количество точек на хроматограмме сократится в 4 раза.

— *Чем плохо сокращение числа точек на хроматограмме?*

— Плохо тем, что форма пика будет описываться неточно, что, в свою очередь, повлечет за собой снижение повторяемости в измерении площади пика. В идеале, пик должен описываться 20-ю точками, а минимально допустимое значение составляет 10 точек на пик.

Если ширина самого первого и самого узкого пика целевого вещества составляет 5 секунд, то постоянная времени не должна быть выше 0.5 секунды.

Если для работы применяется современный детектор с частотой 80–100 Гц, то в случае традиционных, не быстрых разделений (когда время анализа составляет порядка 10 минут и выше) я бы рекомендовал несколько загрузить настройки детектора, чтобы снизить шумы.

— *То есть увеличить постоянную времени?*

— Да. Например, хотя бы до 0.1 секунды, что соответствует частоте 10 Гц.

— *Хорошо. Теперь подобная проблема, но с дрейфом базовой линии при использовании УФ детектирования.*

— Ну, дрейф при градиентном элюировании — это отдельный разговор. Мы обсудим эту проблему тогда, когда будем говорить, собственно, о градиентном элюировании.

Для изократического режима можно выделить три основные причины дрейфа. Одна из них — это загрязнение колонки. Причем загрязнение обратимое, от которого можно избавиться, просто промыв колонку.

— *Как выглядит такое загрязнение?*

— Если загрязнение не очень сильное, то оно выглядит как непрерывная череда широких пиков. Это значит, что в колонке осталось множество веществ, попавших в нее из инжесктированных ранее проб. Они просто не успели из нее элюироваться.

— *Мы обсуждали это, когда говорили о “лишних” пиках.*

— Да. Когда пики от предыдущих инжесктирований становятся очень уж широкими, их начинают воспринимать как дрейф базовой линии.

Кроме того, есть вариант, когда колонка оказывается загрязненной гораздо серьезнее, но ее все еще вполне реально отмыть. Такое случается, когда на колонке долго работают на очень грязной подвижной фазе. Или после работы на грязной подвижной фазе колонку бросили в ящик стола, и она там высохла. Одним словом, при небрежной работе.

В таких случаях загрязнение выглядит как зашкал, или значительный дрейф базовой линии где-то около зашкаливающих значений. Вообще, такое чаще всего случается с обращено-фазовыми колонками. Загрязнить их бывает проще всего.

— *В этом случае колонку вообще бывает реально отмыть?*

— Реально. Дело только во времени и, если мы говорим об обращенной фазе, в наличии значительного объема чистых растворителей. Именно в этом случае, если колонка не отмывается в мягких условиях (смесью ацетонитрил-вода, где ацетонитрила на 20–30 % больше, чем в подвижной фазе), то можно попробовать жесткие условия (смесь ацетонитрил-ТГФ, к примеру, или чистый изопропанол).

— Это ясно. А вторая причина дрейфа?

— Вторая причина дрейфа — это незавершенное кондиционирование колонки. Об этом мы тоже говорили.

— Что оно может занимать по несколько часов?

— При работе с ион-парным реагентом — даже дней. Все верно.

— Третья причина?

— В случае применения подвижной фазы с модификатором (ион-парный реагент, триэтиламин и т.д.), особенно поглощающим УФ излучение ...

— ... или при работе на короткой длине волны?

— Или так, да. В этом случае инжектирование пробы не в подвижной фазе, а в чем-то другом (без модификатора, с другим значением pH) может привести к появлению на хроматограмме “провалов” или “горбов”.

— И что в этом случае делать?

— Самое простое — разбавить образец применяемой подвижной фазой.

Курс 6. Неподвижные фазы для ВЭЖХ: основы. Общий принцип выбора неподвижных фаз

— Есть ли смысл в разнообразии неподвижных фаз?

— Безусловно, есть — иначе его бы не было.

Начнем с того, что с большим разнообразием неподвижных фаз появляется возможность определять большое количество различных соединений.

— *А разве нельзя определить любые соединения, работая на одной неподвижной фазе?*

— Нет, нельзя. К примеру, необходимо определять гидрофильное соединение. На обращенной фазе такое соединение определить нельзя, поскольку оно не будет удерживаться. Обращенно-фазовый режим позволяет разделять и определять только достаточно гидрофобные вещества.

Или, допустим, соединение имеет значительный заряд — на ионообменной фазе его будет невозможно элюировать даже в жестких условиях. Таким образом, соединение определить нельзя, поскольку оно остается на колонке, то есть не проявляется в виде пика.

Вообще, ионная хроматография как раз предназначена для разделения ионных, заряженных соединений. Но в данном случае необходимо взять неподвижную фазу с меньшим удерживанием, чтобы сильно удерживаемое соединение появилось в виде пика на хроматограмме.

— То есть разные неподвижные фазы нужны потому, что они не универсальны?

— Именно так. Даже в рамках одного хроматографического режима разные фазы обеспечивают различное удерживание. А разные хроматографические режимы обеспечивают различный принцип разделения.

Кстати, универсальность определенного подхода на профессиональном языке отражается термином “специфичность”. Универсальный — это неспецифичный. Не универсальный — это специфичный.

— Что это означает на практике?

— Чем менее специфичен режим (или неподвижная фаза), тем легче подобрать условия разделения для произвольной группы соединений.

Ведь в общем же случае эти соединения обладают различными свойствами, то есть стремятся всеми силами не попасть в то узкое окно энергий адсорбции, которому отвечает наблюдаемая хроматограмма. А неспецифичные фазы видят разницу в свойствах различных соединений хуже, поэтому вероятность подобрать условия их совместного присутствия на хроматограмме максимальна.

— Какие неподвижные фазы неспецифичны?

— Специфичность хроматографических режимов (следовательно, специфичность неподвижных фаз) различна. Самым неспецифичным адсорбционным режимом является обращенно-фазовый. А вот гидрофильный и ионный режимы достаточно специфичны.

— Мне кажется, что удобнее всего работать на самых универсальных, неспецифичных фазах. То есть обращенно-фазовых.

— Это потому что тогда у разработчика методики появляется большая вероятность без проблем расположить все целевые соединения на хроматограмме?

— Да.

— Многие считают так же. Во многом, именно поэтому обращенно-фазовая хроматография настолько популярна. Но у этой медали есть очевидная обратная сторона.

— *Какая же?*

— Начнем с того, что если все целевые соединения так легко расположить на хроматограмме, то все компоненты матрицы, примеси, продукты деградации и т.д. — автоматически располагаются на хроматограмме так же легко?

— *Действительно... и получается лес из пиков?*

— Только в случае сложных объектов. И неспецифичного детектирования. Поэтому обращено-фазовые разделения сложных объектов лучше делать с применением высокоспецифичных детекторов, например, масс-селективного. А обращено-фазовые разделения с УФ или рефрактометрическим детектированием применять для разделения сравнительно простых объектов.

— *У неспецифичности есть еще недостатки?*

— Да, есть и второй недостаток неспецифичных режимов, который не зависит от сложности объекта и вида детектирования. Дело в том, что неспецифичное разделение плохо тем, что, как я уже сказал, хроматографическая система плохо видит разницу в свойствах целевых соединений. Догадываетесь, к чему это приводит?

— *К плохому разделению?*

— Скорее, не к плохому, а к неспецифичному. Что-то делится, что-то нет. Гомологи хорошо делятся. Изомеры плохо. Структурно подобные соединения в целом тоже делятся плохо.

— *Необходимо переходить к более специфичному режиму?*

— Не обязательно сразу начинать действовать столь радикальным образом. Часто бывает необходимо добавить лишь немного специфичности.

— Как это выглядит на практике?

— У Вас в записной книжке, я знаю, есть подходящий вопрос, который сам по себе является ответом на только что заданный. Вот этот.

— Зачем для одного вида хроматографии выпускают неподвижные фазы с различными типами прививок?

Да. Вот поэтому и выпускают. Чтобы повысить специфичность разделения в рамках применяемого хроматографического режима.

Вполне логично, что больше всего разнообразных прививок применяют для обращенно-фазовых разделений. Самому неспецифичному режиму иногда полезно добавить немного специфичности. Все хорошо в меру, даже универсальность.

— Говорят, что фазы с отличными от C18 прививками демонстрируют “дополняющую селективность”. Что это значит?

Этот термин выдумали маркетологи в начале 90-х, когда начинались продажи C16-амидных фаз. Неплохой, кстати, термин. Он означает, что C16-амидная фаза тоже применяется для обращенно-фазовой хроматографии, но у нее другая селективность. Если что-то не разделилось на C18 фазе, то есть вероятность, что разделится на C16-амидной — вот каков был основной тезис маркетологов.

Учитывая, что обращенно-фазовый режим негибкий, иметь набор неподвижных фаз с различными селективностями крайне полезно. А учитывая, что обращенно-фазовый режим неспецифичный, и часто применяется в комбинации с достаточно неспецифичным УФ детектированием — иметь такой набор (по крайней мере, разработчику методик) просто необходимо.

Давайте поговорим об этом подробнее в следующем диалоге, который будет посвящен обращенным фазам.

— Хорошо. Но у нас осталась не разобранный тема специфичных режимов и неподвижных фаз.

— С ними все наоборот. Специфичные режимы удобно применять, когда целевых соединений мало, или вообще одно, которое надо определить на фоне очень сложной матрицы, особенно неспецифичным детектором.

То есть для сложных матрицы/или неспецифичного детектирования, вроде рефрактометрического и УФ, лучше применять специфичный режим.

— Получается, что у специфичных режимов много преимуществ и один недостаток — разработчику методики нужно сильно постараться, чтобы разместить все целевые соединения на хроматограмме?

— Да.

— То есть, в итоге, все сводится к квалификации разработчика методик?

— Да. Это, знаете, есть такое крылатое выражение из области кунг-фу: “Ученик бьет кулаком, мастер бьет ладонью, учитель бьет пальцем”. Не стоит переносить его на хроматографию буквально...

— Что кто-то бьет хроматограф?

— Не стоит этого делать. Но начинающему разработчику действительно проще иметь дело с неспецифичной обращенно-фазовой хроматографией. Результат, конечно, не всегда хороший — но сам процесс разработки значительно упрощается.

С ростом квалификации специалист постепенно осваивает более специфичные режимы: гидрофильный, ионный, с переносом заряда, нормально-фазовый. Потом осваивает смешанные режимы. И, в результате, применяет все существующие подходы, отталкиваясь от специфики решаемой задачи, а не от того, что он знает.

Но для работы ему всегда будет нужен целый арсенал различных неподвижных фаз. Без хорошего рабочего инструмента много не навоюешь.

— Я думаю, эта тема раскрыта вполне — идем дальше. Зачем нужны колонки различных типоразмеров, то есть разной длины и с разным размером частиц?

— Любое хроматографическое разделение на данной колонке, при фиксированном максимальном давлении и вязкости, обеспечивает некоторый баланс, или компромисс, между разрешением и скоростью анализа (на профессиональном языке — производительностью).

Если необходимо ускорить анализ, а запаса по давлению нет — приходится жертвовать разрешением. Если это возможно, конечно, если есть запас по разрешению.

Для ускорения анализа можно взять колонку короче. Или взять колонку той же длины, но заполненную более крупными частицами, и увеличить скорость потока. Оба действия приведут к ускорению анализа ценой падения разрешения.

— То есть, различные типоразмеры нужны, чтобы настраивать нужный баланс между качеством разделения и скоростью анализа?

— Совершенно верно.

— А если запас по давлению есть?

— Если хотите ускорить анализ без ухудшения разделения — увеличивайте скорость потока, немного увеличивая длину колонки (ровно настолько, чтобы компенсировать падение разрешения из-за конечной скорости массообмена).

Если хотите увеличить разрешение без потери скорости — уменьшайте диаметр частиц адсорбента (при той же длине колонки и скорости потока).

— Все так просто?

— В общем-то, да. Именно здесь все довольно просто.

— Существуют ли “самые лучшие” колонки?

— Вы и сами сейчас легко ответите на этот вопрос.

— *То есть, нет?*

— Выбор колонки диктуется аналитической задачей. Химия неподвижной фазы может обеспечивать не очень удачную селективность разделения в одном случае, и очень удачную — в другом. То есть не существует “самой лучшей” неподвижной фазы.

В плане типоразмера, в случае высокой селективности разделения (то есть при наличии запаса по разрешению) выбор короткой колонки удачно сократит время анализа. А в случае низкой селективности придется выбирать более длинную колонку, чтобы “вытянуть” разделение за счет эффективности. То есть не существует и “самого лучшего” типоразмера.

— *Но есть же колонки с самым лучшим качеством?*

А вот это есть, да. Есть колонки более качественные, и менее качественные. Я предлагаю обсудить этот вопрос в отдельном курсе.

Курс 7. ВЭЖХ колонка как промышленный продукт. Качество колонки

— Итак, что подразумевается под “качеством” колонки? Какую колонку можно считать качественной?

— А вот этот вопрос — непростой. Ответ будет развернутым.

— *Хорошо, начнем.*

— Качество колонки можно разложить на качество адсорбента и на качество производства колонки. С чего начинать?

— Давайте с качества производства колонки. Как производят ВЭЖХ колонки?

— Есть колонки монолитные и упакованные адсорбентом с определенным размером частиц. Я предлагаю рассмотреть процесс производства упакованных колонок как наиболее широко применяемых.

— *Хорошо.*

— Производство упакованной колонки — это довольно сложный технологический процесс. Колонка упаковывается адсорбентом при помощи специального устройства — упаковочного стенда, который состоит из насоса высокого давления и пакера — резервуара, который заправляют суспензией адсорбента в каком-либо растворителе. На один конец пакера монтируют пустую колонку, выход которой закрыт пористым фильтром (фритом) и гайкой. Другой конец пакера подключают к насосу. Насос включают; суспензия выдавливается из пакера в колонку. Насос продолжает работать, и заполненная

колонка в течение некоторого времени прокачивается подходящим растворителем, как правило, при повышенном давлении. В идеале, после производства колонка промывается и тестируется.

— *Колонка пакуется автоматически?*

— Нет, упаковка производится человеком, оператором. Один человек может работать сразу на нескольких стендах, то есть упаковывать сразу несколько колонок одновременно.

— *В чем заключается сложность процедуры упаковки?*

— В технологии. Каждый рецепт упаковки должен подбираться индивидуально. Качество упаковки зависит от множества параметров: концентрации суспензии, растворителя для приготовления суспензии, растворителя для прокачки колонки, способа упаковки (снизу вверх или сверху вниз, насосом поршневым или пневматическим, при постоянном потоке или постоянном давлении), параметров упаковки (давление, объем прокачки, и т.д.).

Некоторые параметры можно варьировать, но есть параметры, которые влияют на качество упаковки критически. Например, концентрация суспензии: стоит лишь немного с ней не угадать, и колонка не набьется качественно, то есть будет обладать очень низкой эффективностью. Большую роль играет геометрия переходника из пакера в колонку, само качество изготовления корпуса колонки, качество самого адсорбента, его однородность (монодисперсность). В общем, тонкостей много.

— *Какие признаки свидетельствуют о нарушениях в технологии упаковки колонок?*

Ну, либо о нарушениях, либо об изначально плохо разработанной технологии упаковки. Я бы все признаки разделил на две группы — видимые сразу и видимые только через некоторое время.

— *Начнем с признаков, видимых сразу.*

— Нередко бывает, что все купленные ВЭЖХ колонки (сразу же после их доставки) кладут на склад или просто на полку, что в корне неверно.

Сразу же после доставки все новые колонки необходимо тестировать на качество упаковки. Если система менеджмента качества лаборатории не содержит такого СОП как “тестирование ВЭЖХ колонок”, настоятельно рекомендую внедрить его как можно скорее.

По тестированию колонок у нас будет отдельный разговор. Здесь же отмечу, в плане проверки качества производства колонки, ключевыми параметрами тестовой хроматограммы являются: эффективность колонки (как правило, измеряется по последнему пику), асимметрия пиков, а также вообще их форма.

Об очевидном нарушении упаковки (трещины, полости) свидетельствует расщепление пиков на тестовой хроматограмме.

О неудачно проведенной упаковке свидетельствует невысокая эффективность колонки. Эффективность колонки считается удовлетворительной, если достигнутая удельная эффективность (количество теоретических тарелок на метр, т.т./м) превышает некоторое референсное значение, типичное для адсорбента данного диаметра и типа.

— *Примеры, пожалуйста.*

— Для силикагельных обращенных фаз (С18, С8) и чистого силикагеля полностью пористые 5-ти микронные адсорбенты пакуются в 80–100 т.т./м, полностью пористые 3-х микронные адсорбенты — около 120 т.т./м, поверхностно-пористые 2.5–2.7 микронные адсорбенты — около 250 т.т./м. То есть в пересчете на 150 мм колонку эффективность колонок будет составлять, соответственно, 12 000–15 000, около 18 000 и около 37 500.

Однако следует учесть, что силикагельные колонки с некоторыми другими прививками могут паковаться не так хорошо, например, цианопротильные (нитрильные), фенильные, многие ионные колонки на основе силикагеля.

Ну и отдельная тема — это полимерные колонки. У них средние удельные эффективности гораздо ниже, чем у силикагельных. Например, 30 т.т./м для 5-ти микронного полимера — это очень хорошо.

— А что с симметрией пика?

— Пики на тестовой хроматограмме должны быть симметричными, с коэффициентом асимметрии в пределах от 0.95 до 1.2, а лучше — в пределах от 0.98 до 1.1. О плохой упаковке свидетельствует как увеличенная правая, так и увеличенная левая асимметрия пика.

О значительных нарушениях упаковки свидетельствует наличие заметного резкого порожка, которым заканчивается пик (то есть порожек расположен у основания пика справа).

— Больше очевидных признаков некачественной колонки нет?

— Больше нет. Дальше речь пойдет о таком типе брака, который почти невозможно распознать при покупке новой колонки. Этот тип брака называется — нестабильная упаковка.

Нестабильная упаковка вначале ведет себя как абсолютно нормальная. Потом, как правило, после пары недель или даже месяца использования, эффективность резко падает — в два раза и более. И даже переворачивание колонки не дает никакого положительного эффекта. То есть упаковка колонки разом разрушается.

— Чем это обусловлено?

— Нестабильность упаковки свидетельствует о том, что технология ее производства (в данном типоразмере) еще не отлажена как следует. Я предлагаю поговорить о проблемах в производстве колонок поподробнее в отдельном курсе.

— Это было бы замечательно. Но неужели никак нельзя предугадать, что упаковка окажется нестабильной?

— В общем случае — никак. Но на всякий случай опасайтесь колонок с четко выраженной левой асимметрией пиков (коэффициент асимметрии менее 0.95). Такая асимметрия может свидетельствовать о нестабильности упаковки.

И есть еще другая неприятность, которая может случиться с колонкой совершенно неожиданно: выходной фритт сдвигается относительно

своего штатного положения, и весь адсорбент вытекает из колонки через детектор в слив.

— *Звучит ужасно. И часто такое случается?*

— Этот тип брака обусловлен либо некачественными корпусами, либо тем, что производитель еще не до конца адаптировал свою технологию упаковки к корпусам определенного типа. Соответственно, у определенных производителей этот брак не встречается никогда, а у некоторых — довольно часто.

— *И с этим ничего нельзя поделать?*

— Нет, кое-что можно. Для начала, поменьше увлекаться такими способами промывки колонки, которые приводят к дестабилизации ее упаковки. Например, не следует промывать колонку изопропанолом после воды, или наоборот — переход между изопропанолом и водой можно делать только через ацетонитрил.

Для ионных колонок (даже на силикагельной основе, а тем более для полимерных) нельзя резко изменять концентрацию соли в подвижной фазе. Например, не следует промывать ионную колонку после применения 100 мМ соли сразу чистой водой.

Кроме того, промывать (и даже кондиционировать) колонки желательно вообще не на рабочем приборе, а на отдельном насосе. Тогда адсорбент из колонки, в случае чего, не попадет в детектор, а сразу в слив.

— *А насколько опасно попадание адсорбента в детектор?*

— На старых традиционных детекторах типа УФ, рефрактометров, флуориметров — вообще не опасно, адсорбент просто пройдет через детектор.

На новых детекторах, оснащенных кюветами с узкими путями и тонкими стальными подводными капиллярами, возможны проблемы. В лучшем случае придется заменить входной подводный капилляр, в худшем — всю кювету. Ну и совсем неприятно, если адсорбент

попадает в масс-селективный детектор, или испарительный детектор светорассеяния.

— *Можно ли обезопасить себя от попадания адсорбента в детектор?*

— Можно, например, ставить ин-лайн фильтр после колонки. Размывание, по идее, это не сильно увеличит — поскольку в этом случае фильтр ставится после колонки. А от попадания адсорбента детектор будет защищен.

— *Спасибо. А вообще, в каких случаях можно попытаться заменить плохо упакованную колонку у производителя?*

— Только в случае явных признаков бракованной упаковки: расщепленных пиков, эффективности значительно ниже заявленной, асимметрии значительно выше заявленной предельной. При этом претензию надо предъявлять сразу после получения колонки, то есть без проволочек.

— *А что значит эффективность, “значительно ниже” заявленной? Если она просто ниже заявленной — это не аргумент?*

— Нужно показать, что эффективность колонки ниже заявленной хотя бы процентов на 20–30, не меньше. Иначе претензию не примут — скажут, что плохо тестировали. И, может быть, даже окажутся правы.

Но хорошее впечатление на производителя (или поставщика) окажет наличие у пользователя официального СОПа компании по тестированию колонок. Это существенно увеличит шансы пользователя в любых разбирательствах относительно качества колонок.

— *А что с нестабильными упаковками?*

— Забудьте про это. Доказать брак колонки в случае нестабильной упаковки невозможно. Просто не покупайте ту колонку, упаковку которой считаете нестабильной.

— *То же самое с колонками, из которых вытекает адсорбент?*

— Да.

— *Хорошо. Тогда как обезопасить себя от покупки плохо изготовленной колонки?*

— Для начала, покупать только колонки, для которых производитель гарантирует в сертификате параметры качества ее упаковки.

Обратите внимание, что не для всех колонок производитель указывает предельную величину асимметрии пика слева. Например, $0.95 < A_f < 1.2$, а не просто $A_f < 1.2$.

Более того, во многих сертификатах приведены просто параметры данной колонки, или же некоторой колонки данного типа. Однако никакие значения параметров колонки вообще не гарантируются! Будьте бдительны с такими колонками!

— *Что значит “некоторая колонка данного типа”? В сертификате приведены результаты тестирования той колонки, к которой приложен сертификат. Разве не так?*

— В общем случае — не так. Как правило, тестируют лишь одну колонку из целой серии. Так что картинка тестового разделения, или значения эффективности и асимметрии, посчитанные из этой картинке, не должны вводить пользователя в заблуждение. Значение имеют лишь гарантии поставщика, зафиксированные в сертификате.

— *Хорошо. Что дальше?*

— Ведите статистику по закупаемым колонкам. Внимательно относитесь к признакам нарушения упаковки колонки, фиксируйте их документально. Если упаковки от определенного поставщика слишком быстро разрушаются без видимых причин (на хорошо отработанных методиках, при квалифицированном персонале) — попытайтесь сменить производителя. Если в лаборатории внедрена система менеджмента качества, то все вопросы, касающиеся закупки, тестирования, замены колонок, смены поставщика (производителя) — должны быть зафиксированы в специальном СОПе.

Регулярно тестируйте колонки специальными тестами — о них у нас пойдет отдельный разговор.

Покупайте колонки либо напрямую у производителя, либо у ответственных продавцов, с которыми можно вести диалог, договариваться, которые отвечают на электронные письма. Покупка у ответственных дилеров может быть даже предпочтительнее, поскольку крупный производитель, как правило, менее настроен на контакт с покупателем всего нескольких колонок.

— *Теперь перейдем к качеству изготовления адсорбента для производства колонок. Итак, какими параметрами характеризуется качество адсорбентов?*

— Давайте я сначала перечислю требования к качеству адсорбента, которые предъявляет компания, набивающая колонки, к поставщику адсорбционного материала. Может быть, эта тема не интересна абсолютно всем пользователям, но точно интересна тем из них, кто закупает много колонок и хочет глубже разобраться в вопросе их качества.

— *Разумно. Давайте с этого и начнем.*

— Как ни парадоксально, но производителя колонок, который набивает колонки “чужим”, то есть покупным адсорбционным материалом, не интересуют абсолютно все параметры качества адсорбента. Его напрямую интересуют лишь те из них, которые влияют на качество и воспроизводимость упаковки колонок данным адсорбентом.

— *То есть “химия” колонки его не очень интересует?*

— Да, не очень, потому что рекламацию на невоспроизводимость адсорбционных свойств он не примет. Даже компания, которая занимается производством колонки “с нуля” (а таких компаний становится все меньше), примет такого рода рекламацию только от очень крупного, стратегически важного клиента.

Итак, для производителя колонок важны:

– дисперсность адсорбента (распределение частиц по размеру, отсутствие мелкой пыли и крупных агломератов частиц);

- физические свойства адсорбента (пористость, удельная поверхность, средний диаметр пор, распределение пор по размеру);
- химическая стабильность прививки (чтобы прививка не разрушалась с течением времени, или в определенных условиях);
- и воспроизводимость от партии к партии вsex выше перечисленных параметров.

— *А какие из них важнее всего?*

— Я думаю, что дисперсность. Наличие мелкой пыли и крупных агломератов в адсорбенте резко снижает эффективность упаковки. Кроме того, наличие мелкой пыли приводит к быстрому засорению фритов колонки и выходу колонки из строя.

Конечно, и от пыли, и от агломератов можно избавиться седиментацией нужной фракции в подходящем растворителе. Раньше всегда так и делали. Но сейчас качество адсорбентов выросло, и от недостаточно качественного силикагеля проще отказаться, чем дополнительно работать над улучшением его дисперсности.

— *Так, а какие параметры качества адсорбента важнее для конечного пользователя?*

Для конечного пользователя, безусловно, важны:

- химическая инертность адсорбента; для фаз на основе силикагеля — это чистота силикагеля, то есть минимальная загрязненность силикагеля примесями металлов;
- воспроизводимость от партии к партии адсорбционных свойств материала, то есть селективности и удерживания.

Проблема стандартной процедуры тестирования ВЭЖХ колонки состоит в том, что она позволяет установить лишь качество упаковки колонки. Но не позволяет определить ни химической инертности адсорбционного материала, ни воспроизводимости от партии к партии его адсорбционных свойств. Для этого нужны более “умные” тесты.

— *Да, я помню, что у нас будет отдельный о них разговор. Теперь же хотелось бы услышать — на что влияет химическая инертность адсорбента?*

— Химическая инертность адсорбента влияет на симметрию пиков соединений, образующих комплексы с переходными металлами. Учитывая, что в той или иной мере комплексы n-d типа могут образовывать практически все азотсодержащие органические соединения — параметр это действительно важный.

Чем больше примесей — тем асимметричнее пик соединения, склонного к образованию комплексов. Особенно сильно на “грязных” силикагелях “хвостят” хелатные соединения — а к ним относятся множество фармацевтиков, особенно класса пептидов.

— *Чистоту силикагеля можно как-то определить без теста?*

Иногда производители колонок указывают чистоту силикагеля в процентах. У действительно качественного силикагеля показатель чистоты не может быть ниже 99.999 %. Фазы на основе именно такого силикагеля рекомендуется применять в фармацевтике. Но для более простых разделений вполне допустимо использовать фазы на основе менее чистых, соответственно, и менее дорогих силикагелей.

Курс 8. Недвижные фазы для обращенно-фазовой ВЭЖХ

— Существует огромное количество марок обращенно-фазовых колонок. Как в них не запутаться?

— Большое количество марок ничего, по сути, не значит; марка — это всего лишь торговое название. На самом же деле, количество различных типов обращенных фаз, доступных на рынке, весьма ограничено.

Вы удивитесь, если я скажу, что мне для разработки методик далеко не всегда хватает всего имеющегося разнообразия доступных обращенных фаз?

— Да, в это сложно поверить.

— И, тем не менее, это так. Чтобы избавиться от впечатления громадности предложения на рынке обращенно-фазовых колонок, всегда читайте описание применяемой неподвижной фазы на сайте производителя. И тогда с большой долей вероятности обнаружите, что весь Ваш рабочий арсенал состоит из практически идентичных колонок. И, скорее всего, большинство колонок будут C18 типа.

— Какие основные типы обращенных фаз доступны на рынке?

— Во-первых, обращенные фазы различаются по типу материала основы. Наиболее распространены фазы на основе силикагеля. Реже применяются полимерные фазы, и еще реже — фазы на основе окиси циркония.

Во-вторых, адсорбенты бывают монолитные и в виде частиц. Наибольшее распространение получили адсорбенты последнего типа.

Таким образом, самый широкий класс адсорбентов для обращенно-фазовой ВЭЖХ представляют химически модифицированные силикагели в виде пористых, или поверхностно-пористых частиц со средним диаметром от 5 до 1.7–1.8 мкм.

Наконец, адсорбенты различаются химией, то есть своей химической структурой — что приводит к различию в проявляемых ими свойствах.

— *Расскажите подробнее о том, зачем для получения обращенных фаз на основе силикагеля их нужно химически модифицировать.*

— Силикагель — это полярный адсорбент. Он не обладает гидрофобностью, соответственно, не может удерживать соединения в обращенно-фазовом режиме. Для получения гидрофобного адсорбента к поверхности силикагеля необходимо привить какой-либо неполярный, гидрофобный реагент. Например, насыщенный углеводород. Проведение реакции по прививке подходящего реагента как раз и называется химическим модифицированием.

— Какие существуют типы прививок для обращенно-фазовых силикагелей?

— Самыми распространенными являются прививки насыщенными углеводородами. Количество метиленовых групп указано в названии колонки; к примеру, обозначение C8 обозначает октильную прививку, то есть —C₈H₁₇, C18 — октадецильную прививку, то есть —C₁₈H₃₇. С химической точки зрения, силикагель с C18 прививкой аналогичен стеклу, на котором закрепили тонкую пленку минерального масла.

Наиболее распространенными являются C8 и C18 фазы; тем не менее, на практике применяют силикагели с различными прививками нормальных алканов: C1, C4, C8, C16, C18, C23, C30.

— *А чем они различаются?*

— В первую очередь, они отличаются селективностью.

Конечно, они отличаются и удерживанием — чем длиннее гидрофобный радикал, тем выше гидрофобность и, соответственно, удерживание. Но эта зависимость не очень резкая. Тем более, гидрофобность зависит не только от длины радикала, но и от плотности прививки — а она выше у реагентов с коротким радикалом. Таким образом, можно взять фазы C8 и C18 типа, и обнаружить, что они проявляют практически одинаковое удерживание.

Но C1 и C4 фазы, конечно же, имеют относительно C18 пониженное удерживание. Их часто применяют для разделения гидрофобных белков — чтобы не расходовать слишком много ацетонитрила.

C30 фазу применяют для анализа очень гидрофобных соединений (например, каротиноидов) с применением неводных подвижных фаз, с которыми C18 фазы, по не вполне понятным пока причинам, “не дружат”. То есть, C18 фазы в подвижных фазах типа ацетонитрил-ТГФ склонны к потере эффективности.

— *А чем вообще определяется величина удерживания на данной обращенной фазе?*

— Правильный ответ тут один — ее гидрофобностью. Однако, к сожалению, пока что не существует единого тестового метода, которым бы пользовались все производители для прямого определения этого параметра. То есть, тесты как раз есть — мы еще поговорим о тестировании колонок в отдельном курсе. Но вот как-то производители никак не могут договориться о едином методе тестирования колонок, или просто не считают это важным делом.

— *И что же делать?*

— Приходится ориентироваться на косвенный параметр, который называется массовой долей углерода (carbon load, %C). Чем больше доля углерода, тем выше гидрофобность и выше удерживание. Однако сравнивать этот параметр можно только для неподвижных фаз одного типа. Например, для алкил-привитых силикагелей с мономерной технологией прививки и с неполярным энд-кеппингом. Узнать массовую долю углерода для данной фазы можно на сайте производителя.

— *А существуют C18 фазы с различным удерживанием?*

— Разумеется, существуют — это же наиболее популярная и массово применяемая фаза. Чтобы синтезировать C18 фазы с различным удерживанием, изменяют плотность прививки C18 лиганда. Чем выше плотность прививки, тем выше массовая доля углерода и выше удерживание.

По значению массовой долей углерода C18 фазы условно разделяются на три группы:

- с повышенной долей углерода (%C = 20–25 %);
- традиционные фазы (%C = 15–18%);
- с пониженной долей углерода (%C = 4–12 %).

Так что проблем с недостатком C18 фаз нет. Если методика не позволяет варьировать состав подвижной фазы для оптимизации удерживания, то можно заменить саму обращенную фазу — на подобную, но с большей или меньшей долей углерода.

Теперь мы можем вернуться к разговору о типах обращенных фаз на основе силикагеля?

— *А есть и другие типы? С другими прививками?*

— Конечно же, и их немало. Пока что мы рассмотрели только алкил-привитые силикагели.

Следующая группа обращенных фаз — это силикагели с C16 или C18 прививками, содержащими полярную группу, как правило, амидную, реже карбамидную или сульфонамидную. Самой широко применяемой фазой этого типа является алкиламидная фаза C16-Amide.

— *В чем состоит преимущество алкиламидных (C16-Amide и подобных ей) фаз?*

— По сравнению с C18 фазой C16-Amide демонстрирует лучшую селективность при разделении соединений, различающихся наличием, или величиной, или строением полярного (гидрофильного) структурного фрагмента молекулы. Например, их хорошо применять для разделения

в обращенно-фазовом режиме метаболитов фармацевтических соединений.

Еще одну группу обращенных фаз составляют силикагели с прививкой ароматическими соединениями, то есть арил-привитые фазы: фенильная фаза (Ph), фенил-гексильная (Ph-C6), нитрофенильная (NP), пентафторфенильная (PFP), нафтильная (NP) и пиренильная (PYE).

Самой распространенной фазой этой группы является пентафторфенильная (PFP) фаза, а самой отличающейся от “традиционной” обращенно-фазовой селективностью обладает пиренильная (PYE) фаза.

— В чем состоит преимущество арил-привитых (PFP, PYE и подобных им) фаз?

— По сравнению с C18 фазой арил-привитые фазы демонстрирует лучшую селективность разделения соединений, которые содержат ароматическую систему. В особенности они полезны для разделения изомеров ароматических соединений, обладающих позиционной изомерией заместителей в ароматической системе.

Сами же соединения могут быть какими угодно — от углеводов до полярных фармацевтиков. Главное — чтобы у них была ароматическая система. Желательно — с заместителями.

Четвертая группа обращенных фаз — это силикагели с комбинированной прививкой, которая состоит из алкильного фрагмента и ионной группы. Ионная группа может либо входить в состав реагента, либо это может быть силикагель со смешанной прививкой, например, C18/SAX, C18/SCX, C18/WCX.

Строго говоря, C18 фазы с сильными анионообменными (C18/SAX) и катионообменными (C18/SCX) группами уже сложно отнести к обращенным. Это, скорее, уже смешанные ионные + обращенные фазы. При этом поведение C18 фаз со слабыми анионообменными (C18/WAX) и слабыми катионообменными (C18/WCX) группами, скорее, более характерно все-таки для обращенных фаз, а не ионных.

— В чем состоит преимущество алкил-привитых фаз с ионными группами (C18/SAX, C18/SCX, C18/WCX)?

Такие фазы можно применять как замену C18 фаз в случаях ион-парных разделений. Ведь алкил-привитые фазы с ионными группами обладают и гидрофобностью, и зарядом. Соответственно, потребность в добавлении ион-парного реагента в подвижную фазу отпадает, он становится просто не нужен.

C18 фазы со слабыми ионообменными группами могут заменить комбинацию “C18 фаза + ион-парный регент” в случае применения короткоцепочечных реагентов. Например, C18/WCX фазу можно взять для замены в случае применения бутан или пентан сульфоната.

C18 фазы с сильными ионообменными группами могут заменить комбинацию “C18 фаза + ион-парный регент” в случае применения длинноцепочечных реагентов. Например, C18/SCX фазу можно взять для замены в случае применения декан сульфоната или додецилсульфата.

— *Ясно. Существуют ли еще какие-либо типы обращенных фаз?*

— Сложно выделить еще какие-либо отдельные группы с уникальным комплексом свойств. Однако, другие типы прививок, безусловно, существуют. Например, холестерин-привитая фаза, C10-CN привитая.

— *Хорошо. Следующий вопрос такой — что такое энд-кеппинг?*

— Крупный реагент для прививки, например, C18, реагирует с силикагелем не на сто процентов. В реакцию вступает порядка трети всех доступных силанольных групп, то есть две трети силикагеля остается незакрытой.

Чтобы уменьшить влияние силикагелевой основы на удерживание и селективность, улучшить инертность фазы и ее гидролитическую стабильность, применяют процедуру энд-кеппинга. Энд-кеппинг дословно переводится как “дозакрытие” — имеется в виду “дозакрытие” силикагеля.

Суть этой процедуры очень простая — проводят такую же реакцию прививки, но вместо реагента с крупной молекулой типа C18

берут реагент с небольшой молекулой типа C1, который реагирует с силикагелем значительно лучше. В результате, поверхность силикагеля “дозакрывается” C1 прививкой.

Кстати, реагент с C1 прививкой называется триметилхлорсилан, и обозначается как TMS.

— *Энд-кеппинг всегда осуществляют при помощи TMS, или есть и другие реагенты?*

— Да, энд-кеппинг может осуществляться при помощи различных реагентов, TMS — это просто самый распространенный из них. Однако совершенно необязательно знать все тонкости энд-кеппинга; большое значение имеет лишь полярность реагента для энд-кеппинга.

Если он содержит лишь неполярные фрагменты (например, традиционный TMS), то энд-кеппинг называется неполярным. Если в энд-кеппирующем реагенте есть какая-либо полярная группа, то такой энд-кеппинг называется полярным.

— *Какими преимуществами обладает полярный энд-кеппинг?*

— Не очень большими, поэтому он и не применяется очень часто. Изначально предполагалось, что полярный энд-кеппинг позволит справиться с проблемой потери смачиваемости (деветтинга) обращенных фаз, которая часто возникает у фаз с интенсивным неполярным энд-кеппингом в 100%-ных водных подвижных фазах.

— *Мы обсуждали этот эффект, когда говорили о причинах нестабильного удерживания в обращенно-фазовом режиме.*

— Да. Так вот, потом оказалось, что для работы с гидрофильными соединениями в обращенно-фазовом режиме неподвижные фазы с полярным энд-кеппингом почти бесполезны. Они хоть и устойчивы к деветтингу, но введение полярных групп уменьшает гидрофобность самого адсорбента, что приводит к ухудшению удерживания.

Тем не менее, для общих нужд фазы с полярным энд-кеппингом применимы ничуть не хуже, чем любые другие фазы. И, разумеется,

они проявляют несколько иную селективность по сравнению с традиционными фазами с неполярным энд-кеппингом. У меня в арсенале есть фазы обоих типов.

— А как узнать тип энд-кеппинга обращенной фазы?

— Проще всего посмотреть информацию на сайте производителя. В сводной таблице, как правило, бывают указаны: тип прививки, массовая доля углерода и, в столбце “энд-кеппинг” – тип энд-кеппинга.

О том, что энд-кеппинг неполярный, свидетельствуют следующие аббревиатуры в соответствующем столбце:

- “endc.” — неполярный энд-кеппинг произвольного типа (не раскрывается производителем);
- “TMS” — неполярный энд-кеппинг триметилхлорсиланом (то есть C1 энд-кеппинг);
- “double” — неполярный энд-кеппинг смесью триметилхлорсилана и диметилдихлорсилана (это тоже C1 энд-кеппинг);
- “bident.” — неполярный энд-кеппинг бидентантным реагентом.

О том, что энд-кеппинг полярный, свидетельствуют аббревиатуры “pol.endc.”, “pol.gr.”, а также, как правило, аббревиатура “proprietary”. Вообще говоря, “proprietary” означает то, что производитель не хочет раскрывать химию энд-кеппинга, но за этим в большинстве случаев скрывается полярный энд-кеппинг.

Иногда тип полярного энд-кеппинга указывается непосредственно в названии фазы, например, C18/NP, C18/Amide. Фактически, в этих случаях производитель рассматривает энд-кеппинг как вторую, дополнительную к основной прививку. Что, в общем, так оно и есть.

— А вообще, что обозначают различные аббревиатуры в названиях обращенно-фазовых колонок?

— Да, существуют несколько общепринятых аббревиатур.

“ODS” или “RP18” — это то же самое, что “C18”.

“MOS” — это “C8”.

“HD” — обращенная фаза с повышенной массовой долей углерода;

“AQ” или “Aqua” говорят о том, что производитель позиционирует обращенную фазу как устойчивую к потере смачиваемости.

“Shell” или “Core” в названии фазы, а также размер частиц 2.5–2.7 указывают на то, что это — поверхностно-пористая фаза.

К примеру, NameSil 100 5ODS — это фаза на основе силикагеля (“Sil” в названии), средний диаметр пор 100 ангстрем, средний диаметр частиц 5 мкм, тип прививки — C18.

NameShell C18-AQ 2.7 — это поверхностно-пористая фаза (“Shell” в названии), тип прививки — C18, производитель позиционирует фазу как устойчивую к потере смачиваемости, средний диаметр частиц 2.7 мкм.

CorName Amide RP — это поверхностно-пористая фаза (редуцированная “Core” в названии), тип прививки — обращенно-фазовая (“RP”) с амидной группой; скорее всего, это C16-Амидная фаза.

— А что обозначают цифры после аббревиатур “C18” и “ODS”, например, “ODS-1”, “ODS-2”, “ODS-3”?

— Скорее всего, таким образом производитель маркирует каждое очередное поколение данной фазы; предположительно, это свидетельствует о каком-либо изменении в технологии производства. Никакой информации для пользователя эта цифра не несет.

— А какими бывают химии полимерных обращенных фаз?

— Нейтральный пористый полистирол-дивинилбензол (PS-DVB) и нейтральные полиметакрилаты. Если мономер метакрилата был получен этерификацией не одноатомным, а многоатомным спиртом, то соответствующие полиметакрилаты называются полигидроксиметакрилатами.

Полистирольные фазы наиболее гидрофобны, по удерживанию они превосходят даже C18-HD фазы с повышенной массовой долей углерода. Полиметакрилаты по гидрофобности примерно соответствуют C18 фазам, а полигидроксиметакрилаты несколько уступают им в плане удерживания.

— *А что с селективностью полимерных фаз?*

— Полистирол-дивинилбензолы со степенью сшивки порядка 50 % по селективности напоминают C18 фазы с интенсивным неполярным энд-кеппингом. Образца 80-х годов, которые еще были неустойчивы к потере смачиваемости.

А полиметакрилаты в плане селективности очень отличаются от C18. Скорее, их свойства напоминают нечто среднее между C16-Амидной (C16-Amide) и пиренильной (PYE) фазами.

— *Почему силикагельные колонки применяют чаще полимерных?*

— По ряду причин. Самая важная — фазы на силикагельной основе значительно эффективнее полимерных фаз. Если лучшие 5 мкм C18 фазы имеют эффективность порядка 100 тыс.т.т./м, то лучшие 5 мкм полимерные фазы имеют эффективность порядка 30 тыс.т.т./м.

Кроме того, оптимальные скорости потока для полимерных колонок примерно в два раза ниже, чем для силикагельных — что сказывается на времени разделений. Полимерные фазы средней степени сшивки, как правило, имеют верхний предел по давлению порядка 150 бар, что также накладывает на их применение некоторые ограничения.

Наконец, полимерные колонки достаточно сложно упаковывать, поэтому не все производители колонок выпускают стабильные нейтральные полимерные фазы для обращенно-фазовой хроматографии. Особенно тяжело получить стабильные полистирол-дивинилбензолные упаковки. Полиметакрилатные упаковки в целом гораздо стабильнее полистирольных.

— *А в чем вообще смысл применения полимерных фаз?*

— Основная причина состоит в том, что на полимерных фазах можно работать в щелочных средах. Причем безо всякой угрозы выхода колонки из строя.

Вопрос в другом — а насколько действительно важна возможность работать в обращенно-фазовом режиме в щелочной среде? По моему

мнению, для низкомолекулярных соединений — не очень важна, и в подавляющем большинстве случаев вполне достаточно возможности работать в нейтральной и кислой среде.

Но для разделения пептидов и белков хорошо иметь возможность работы в щелочной среде в качестве запасного варианта. Эти соединения порой ведут себя не очень предсказуемо, и иметь запасные варианты для их разделения — это всегда не лишне.

Кроме того, я широко использую микропористые полимерные фазы для эксклюзионных и смешанных обращенно-фазовых/эксклюзионных разделений. Но это уже несколько выходит за рамки нашей беседы.

— *Хорошо. А теперь расскажите, в чем состоят преимущества применения поверхностно-пористых обращенных фаз, и каковы их недостатки?*

— Основное преимущество поверхностно-пористых фаз — это их большая, по сравнению с полностью пористыми фазами, эффективность.

Прибавка в эффективности зависит от диаметра частиц. Она максимальна в том случае, когда диаметр частицы составляет 2.5–2.7 мкм. По этой причине при работе на поверхностно-пористых фазах наиболее часто применяют именно этот размер частиц, хотя есть и 5 мкм, и 1.8 мкм фазы такого типа.

— *И какова прибавка в эффективности для 2.5–2.7 частиц?*

— В реальных рабочих условиях поверхностно-пористые фазы оказываются примерно вдвое эффективнее полностью пористых.

— *Это серьезно. Что же сдерживает применение поверхностно-пористых фаз?*

— Существует несколько факторов, ограничивающих применение поверхностно-пористых фаз. Большинство из них устранимо.

К примеру, в настоящий момент на рынке есть как поверхностно-пористые фазы высокого качества, так и невысокого. Проблема

последних состоит в том, что они “хвостят”, то есть дают асимметричные пики — что легко устанавливается при помощи обычного теста колонки на эффективность упаковки (мы уже обсуждали эту процедуру, когда говорили о качестве колонок).

Вторая проблема — ассортимент “химий” поверхностно-пористых фаз пока что очень скуден. Доступны C18 и чистый силикагель, а также изредка у некоторых производителей встречаются PFP и C16-Amide фазы.

Но, разумеется, все эти проблемы устранимы, и, я думаю, через некоторое время все будет в порядке. И качество материала в среднем подтянется, и ассортимент фаз станет шире.

— *А какими принципиальными недостатками обладают поверхностно-пористые фазы?*

— Во-первых, меньшей емкостью. Для ВЭЖХ-МС приложений это, по сути, несущественно. А для рутинных приложений с УФ, и особенно рефрактометрическим детектором, этот факт необходимо учитывать. И не ставить поверхностно-пористые фазы на те разделения, в которых необходимо серьезно нагружать колонку.

Во-вторых, поверхностно-пористые фазы обладают меньшей способностью к удерживанию — из-за менее толстого пористого слоя и, соответственно, меньшей удельной поверхности. В случае обращенных фаз это хорошо видно по значению массовой доли углерода: при одинаковой технологии прививки массовой доле 18 % для полностью пористых фаз соответствует массовая доля 9 % для поверхностно-пористых фаз.

— *Потому что удельная поверхность последних примерно вдвое меньше?*

— Именно так. Поэтому для удерживания гидрофильных соединений в обращенно-фазовых условиях поверхностно-пористые фазы подходят не очень хорошо.

Курс 9. Стандартные ошибки, допускаемые при работе с ВЭЖХ оборудованием

— В этот раз мы поговорим о типичных ошибках, которые допускают при работе с ВЭЖХ оборудованием. Начнем с того, что больше всего накопело.

Тогда — с неправильно организованного рабочего места.

— Неожиданно! И что там бывает настолько плохо организовано?

— Приборы в виде огромных этажерок, и даже небоскребов. Блоки, нагроможденные друг на друга. Люди забираются по лестницам-стремянкам, чтобы открыть сливной клапан на насосе. Или хуже — чтобы поставить на самый верх такого “небоскреба” емкость с подвижной фазой. Пятилитровую. И поднимаются девушки. Заметьте, без степени мастера спорта в области альпинизма.

— Кошмар.

— Или нет стремянки. Забираются на хлипкую табуретку. Падают с нее. На прибор. Обливают его подвижной фазой.

— А зачем вообще прибор устанавливают в виде этажерки?

— Может быть, экономят место. А для кого-то это просто кажется красивым. Такие вот электронные джунгли из стали и пластика.

— Для кого-то, кто не работает на этом приборе.

— Естественно. Потому что для людей это — сплошное мучение. И, естественно, противоречит всем нормам безопасности труда. Но аудиторы ходят и в упор этого не замечают.

— *Потому что у всех так.*

— Потому что у всех так. Мы же говорим о типичных ошибках.

Вот блоки, нагроможденные друг на друга — из этой же серии. Например, насос на самом верху этажерки. Очень часто его любят ставить прямо на детектор. Чтобы если что-то полилось из насоса, тут же попало бы на детектор. Видимо, такая логика.

— *Ну, блоки же закрыты крышками.*

— Там есть иногда еще клавиатура, табло. А если в подвижной фазе есть значительная доля ТГФ?

Когда был очень молод, я так растворил половину панели детектора. Хорошая такая панель была, из мягкого пластика, больше похожего на резину. Панель с клавиатурой просто стекла вниз.

— *А как правильно располагать блоки?*

— Насос, в идеале, должен стоять отдельно. Желательно, не на столе, а на специальной невысокой подставке — чтобы с ним было удобнее работать. Бутыли с подвижной фазой лучше ставить на стол рядом с насосом. Но если места нет — то, в крайнем случае, можно и на насос, но только в специальной подставке для растворителей. Автосамплер можно ставить на насос, чтобы загружать его стоя, или прямо на стол рядом с насосом, чтобы загружать его сидя.

Ручной инжектор я бы рекомендовал закрепить на штативе, а не фиксировать его на каком-либо из блоков.

— *Почему?*

— Это просто удобно в работе. Каждый может отрегулировать высоту расположения инжектора под свой рост, под привычки

(инжектирование стоя или сидя). Кроме того, штатив с инжектором всегда можно легко переставить, подвинуть, инжектор со штатива элементарно при необходимости снимается. Преимуществ — масса.

Если закрепить инжектор повыше, то ниже на том же штативе можно установить колонку. При этом расстояние от инжектора до колонки будет минимальным — можно будет применять для соединения стандартные капилляры длиной 15 см.

В принципе, на штативе можно даже закрепить в вертикальном положении небольшой контактный термостат.

Если ручной инжектор уже установлен внутри большого воздушного термостата с вертикальным расположением колонки, то такой термостат логично ставят на стол рядом с насосом.

— *А если расположение колонки в термостате — горизонтальное?*

— Термостаты такого типа чаще применяют в связке с автосамплером. В этом случае рядом с насосом можно поставить на стол термостат, а на термостат поставить автосамплер.

— *А детекторы?*

— Детекторы можно установить одной этажеркой сразу за инжектором или термостатом. А компьютер (или монитор с клавиатурой и мышкой) — уже за детекторами. Подальше от насоса и бутылей с растворителями.

А вообще, неправильно организованное рабочее место включает в себя не только неудачную компоновку прибора. Сюда же можно отнести: размещение приборов рядом с источником тепла или холода, плохое освещение лаборатории, недостаточную шумоизоляцию, ненадежное электроснабжение, отсутствие достаточного места, рабочих поверхностей.

Будем обсуждать все это по отдельности?

— *Я думаю, тут и так все понятно. Давайте пойдём дальше.*

— Хорошо. Вот, к примеру, есть такая комплексная организационная ошибка, состоящая, по сути, из трех. Первая ошибка — не вести лабораторный журнал. Журнал обязательно ведут сотрудники отдела QC, то есть контроля качества. А вот исследователи из отдела R&D, случается, грешат тем, что ведут журнал спустя рукава, или вообще не ведут.

Записывают, к примеру, только условия финального разделения, а комментарии к промежуточным промывкам, кондиционированиям, неудачным разделениям — не пишут. А потом оказывается, что колонка вышла из строя, а почему — уже не понятно. Или разделение сначала получалось, а потом перестало получаться. И тоже неясно, почему так вышло — ведь не осталось никаких записей о том, что делали с колонкой.

— *Вторая ошибка?*

Ведут лабораторный журнал неправильно. Надо понимать, что для сотрудников отдела контроля качества (QC) и для сотрудников отдела исследований и разработок (R&D) форма ведения журнала не может быть одинаковой в принципе.

В контроле качества комплекс из хроматографа с колонкой и методикой применяется, по сути, как сложная линейка, инструмент для проведения измерения. Измерение идет согласно утвержденному СОПу. И главная задача для сотрудника отдела QC — это ничего не перепутать. Его лабораторный журнал должен подтверждать то, что он все сделал согласно документу, стадия за стадией. Чтобы в случае претензий он смог снять с себя подозрения.

Упор здесь надо делать на учет, на надлежащую маркировку всех образцов, проб, реагентов, колонок и т.д. На правильность приготовления растворов стандартов, проб. Особое внимание должно уделяться всем отклонениям от привычных результатов и привычного протекания всех процессов.

— *А что важно для разработчиков?*

— Внимание разработчика должно быть сконцентрировано на двух вещах. Во-первых, на истории применяемых им колонок: как, чем они

промывались, кондиционировались, как изменялись их характеристики и свойства в процессе эксплуатации.

Во-вторых, записи в лабораторном журнале должны давать ключ к пониманию логики исследователя при разработке данной методики. Должно быть понятно, зачем он совершил то или иное действие, взял ту или иную колонку, или каким-либо образом изменил подвижную фазу.

— *То есть в рабочем журнале разработчик должен объяснять свои действия?*

— Да. Причем в первую очередь — себе. Потому что за неделю-другую все забывается.

А разработчик всегда должен быть готов нести ответственность за специфичность и робастность своих разделений. И если с предложенным им разделением возникают какие-либо проблемы, он всегда должен быть готов эти проблемы диагностировать.

— *Для этого ему и нужно записывать историю колонок и историю разработки методики?*

— Именно так.

— *Хорошо. А что за третья ошибка? Видимо, также связанная с ведением лабораторного журнала?*

— Да, а именно — когда делают слишком подробные записи в лабораторном журнале. В этом случае его ведут однозначно в электронном виде. Такого количества записей бумага не выдерживает.

— *Как записи могут быть слишком подробными? Приведите пример.*

— “11:00. Мне необходимо приготовить смесь для промывки колонки, иду в комнату номер 205.”

“11:05. Отмеряю 100 мл ацетонитрила и 100 мл воды. Смешиваю их.”

“11:15. ...”

— *Но так же писать — бессмысленно...*

— Это называется — тайм-менеджмент. В плохом, разумеется, смысле. Во-первых, человек тратит свое время не на работу, а на записи. А как в таких условиях работать разработчику — я вообще не представляю. Писать “11:00. Начал думать над проблемой”?

А во-вторых, по таким записям в журнале невозможно ничего отследить. Аудитору, или руководителю нужно потратить часы, чтобы прочитать все записи и хоть что-то понять. То есть, лабораторный журнал не выполняет своих прямых функций.

— *Что же, это было познавательно. Перейдем теперь к другой тематике?*

— Непосредственно к ошибкам при работе с прибором. Для начала к тем, которые связаны с различными видами промывок.

— *Хорошо.*

— Не промывают жидкостную систему прибора в конце дня, если применяемые подвижные фазы сделаны на основе солевых буферов. Это приводит к достаточно быстрому выходу насоса из строя.

От солей жидкостную систему лучше промывать горячей дистиллированной водой, предварительно сняв хроматографическую колонку. Инжектор и детектор можно соединить при помощи капилляра.

— *Дальше.*

— Плохо промывают жидкостную систему прибора при переходе от подвижной фазы с кислой (или щелочной, что случается реже) реакцией на подвижную фазу с нейтральной реакцией.

Отмывать жидкостную систему от кислоты (или щелочи) лучше всего обычной водой при комнатной температуре. К примеру, пропуская ее при повышенной скорости потока (5–7 мл/мин) в течение 5–10 минут. Разумеется, сняв предварительно колонку с инжектора.

— *Дальше.*

Проведение бессистемных и необоснованных промывок колонок — об этом мы уже беседовали.

— Да, когда говорили об эксплуатации обращенно-фазовых колонок.

— Точно. Напомню, что промывки плохо переносят ионные неподвижные фазы любого типа и вообще любые полимерные фазы. И особенно плохо — ионные полимерные фазы.

А так, в общем, в правильной промывке колонки правильным растворителем нет ничего плохого. Кроме необходимости заново кондиционировать колонку.

Проведение же бесконечных промывок, скорее всего, говорит всего лишь о каком-либо непонимании создавшейся ситуации.

— Что еще?

— Скажу теперь неожиданную вещь. По возможности не применяйте посуду из темного стекла. Ни бутылки, ни виалы, ни пробники — ничего. Пусть вся посуда будет из обычного прозрачного стекла — и точка.

— Почему?

— Потому что в темной посуде не видно ее содержимого. Не видно эмульсии, опалесценции, осадка, расслоения фаз, изменения цвета — ничего не видно. Что бы ни случилось с подвижной фазой или с пробой — это не контролируется. А в результате, как обычно, гибнут ни в чем не повинные колонки.

К тому же, ну зачем нужны бутылки из темного стекла?

— И зачем?

— Допустим, это логично, что органические растворители поставляются именно в темных бутылках. Но применение темных бутылей как емкостей для подвижной фазы — вот это уже совершенно бессмысленно.

А зачем нужны пробники из темного стекла?

— Для защиты фоточувствительных целевых соединений.

— И что, это прямо такой частый случай? Нет, случай нечастый. Хорошо, применяйте темные виалы именно в таких случаях.

Но, вообще говоря, в автосамплере и так довольно темно. А вот зато в диодно-матричном детекторе на узкой кювете сконцентрировано все излучение 30-ти ваттной ксеноновой лампы. И мало кого это смущает, правда?

— Да, действительно...

— В общем, используйте бутылки и виалы из обычного стекла — и колонки реже будут выходить из строя по курьезным и нелепым причинам.

Теперь поговорим о дегазировании подвижной фазы...

— Да, популярная тема.

— А ошибка, в общем-то, одна: не дегазируют. Если подвижная фаза состоит из смеси органических растворителей, это выглядит вполне логично. Но если это водно-органическая подвижная фаза, и, к тому же, водной части в ней — значительная доля, то дегазировать ее необходимо.

Часто приводимый аргумент идеологических противников дегазирования — в их приборе уже есть смеситель, который готовит подвижную фазу, и дегазатор, который замечательно удаляет из нее воздух. И ставят в первую линию недегазированный буфер, а во вторую — ацетонитрил.

Что ж, смеситель действительно смешивает подвижную фазу точно. Но дегазатор не может справиться с объемом выделяющегося воздуха. Он предназначен для доочистки подвижной фазы от воздуха, но не для борьбы с “пузырями”. Так что лучше готовить подвижную фазу и дегазировать ее вручную, самостоятельно.

Кстати, этот рецепт — поставить в первую линию недегазированный буфер, а во вторую поставить ацетонитрил — является одной из наиболее частых ошибок при градиентном элюировании, и мы обязательно разберем ее в соответствующем курсе.

И раз мы коснулись вопроса приготовления подвижной фазы, давайте разберем связанные с этим типичные ошибки.

— *Давайте. Что за ошибки?*

— Ну, первая, собственно, как раз и состоит в неправильном смешивании подвижной фазы. А именно — смешивают растворители в одном цилиндре. Это категорически запрещается делать. Дело в том, что объем смеси растворителей в общем случае не равен сумме объемов этих растворителей по отдельности.

— *То есть объем при смешивании изменяется?*

— Совершенно верно. Например, объем смеси воды и ацетонитрила меньше суммы объемов воды и ацетонитрила.

— *То есть каждый компонент подвижной фазы необходимо отмерить по отдельности, а потом смешать?*

— Да. И отмерять каждый из растворителей лучше отдельным цилиндром.

— *Вторая ошибка?*

— Ее тоже удобно проиллюстрировать на примере смеси ацетонитрил-вода. Ацетонитрил и вода при смешивании сильно охлаждаются. И ошибка в этом случае заключается в том, чтобы начать пользоваться подвижной фазой, не дождавшись, пока ее температура не сравняется с температурой окружающей среды.

Ну и закончить курс хотелось бы ошибками, связанными с неправильным ручным инжектированием.

— *Про правильное инжектирование мы уже беседовали, когда рассматривали причины невоспроизводимости площади пика.*

— Да, здесь два главных правила: не пользоваться частичным заполнением петли (то есть объем инжектирования всегда должен составлять объем петли) и дозировать в инжектор, по крайней мере, двойной-тройной избыток пробы — петля сама отсечет излишки.

Далее, ручной инжектор необходимо промывать, причем промывать правильно.

— *А об этом мы говорили, когда рассматривали причины появления “лишних пиков”.*

— Именно. Забывают промывать ручной инжектор обычно те, кто привык к автосамплеру. Автосамплер промывает инжектор и иглу шприца автоматически — а при ручном инжектировании это приходится делать самостоятельно.

Зато при промывке инжектора и шприца вручную можно пользоваться собственной процедурой промывки — если ее, конечно, сначала придумать. Ведь однократная промывка подвижной фазой далеко не всегда бывает эффективной. Когда компоненты предыдущих проб остаются на элементах инжектора, происходит загрязнение текущей анализируемой пробы. Этот эффект называется перекрестным загрязнением проб. На английском — керри-овер.

— *Или эффектом памяти, мемори эффект.*

— Эффект памяти — это слишком общий термин, он может быть о чем угодно. Лучше в данном случае говорить именно о перекрестном загрязнении проб.

— *Хорошо. В общем, можно комбинировать различные растворители, чтобы эффективнее промывать инжектор.*

— Да. И в конце промывать все подвижной фазой.

Курс 10. Полезные подсказки для тех, кто хочет работать эффективно и с удобством

— Знать, какие бывают ошибки при работе с ВЭЖХ оборудованием — это, конечно, немало. Но я бы рискнул дать еще несколько полезных советов тем, кто хочет работать на приборе эффективно и с удобством.

— *Что ж, с интересом послушаем.*

— А начнем мы также с компоновки и расположения прибора.

— *Но мы же только что говорили об этом...*

— Мы разбирали явные ошибки. А здесь я посоветую, как можно дополнительно улучшить уже неплохую компоновку.

Итак, сначала — о компьютере. Если все блоки прибора управляются не вручную, а с компьютера — озаботьтесь тем, чтобы насосом и автосамплером можно бы было легко управлять, стоя непосредственно около них. А то обычно для любых операций с насосом требуются два человека: один что-то делает с насосом, а другой дежурит “на кнопке” у компьютера.

Второе. Современные фирменные программы ориентированы, прежде всего, на то, что прибором будут пользоваться как сложной линейкой в рамках задач по контролю качества — поэтому в них заложено так много протоколов. Но просто хроматографисту, исследователю, разработчику — это все совершенно ненужно; здесь требуется адекватное графическое отображение всего происходящего с прибором в режиме реального времени.

— *То есть изображение хроматограммы.*

— Изображение хроматограммы на всех подключенных детекторах, текущее состояние блоков: насосов, детекторов. Текущее давление, время и так далее.

И, главное, вся эта информация должна быть доступна оператору в любой момент. Вот он работает где-то неподалеку, например, готовит пробы или заполняет журнал. То есть не сидит как зомби около монитора, а занят своими делами. Но он должен при этом контролировать все, что происходит с прибором.

— *И как всего этого добиться?*

— Решений, наверное, можно придумать много. Я лишь подскажу самое, на мой взгляд, простое и дешевое. Закрепите на стену большой плазменный монитор, который будет дублировать экран компьютера. И поставьте вместо проводной мыши — беспроводную. Большой монитор надо разместить таким образом, чтобы он был виден как можно лучше со всех точек в комнате.

Все остальное — это уже частные дела. У нас в лаборатории за прибором располагаются стеллажи, так что плазму на стене не закрепешь. Поэтому большой монитор просто установлен сверху стеллажа.

— *Интересное решение. Все остальные советы такие же творческие?*

— Боюсь, что нет, все остальные советы более тривиальные. Но не менее действенные. Например, никогда не располагайте колонки или термостат колонок таким образом, чтобы в случае падения колонка падала на пол. Ручной инжектор с колонкой, закрепленные на одном штативе, просто отодвиньте от края стола вглубь; так же поступите с контактным термостатом, а также воздушным термостатом с вертикальным расположением колонки. Термостат с горизонтальным расположением колонки лучше поставьте на стол (он не должен быть частью “этажерки”) и также отодвиньте от края стола вглубь.

Места на столе, куда может упасть колонка, застелите чем-нибудь мягким, например, поролоном. Всегда следите за тем, чтобы

установленная колонка не “провисала” на капиллярах, чтобы она всегда была надежно закреплена.

Также очень важен правильный выбор капилляров и фитингов.

— Да, это очень животрепещущая тема. Давайте остановимся на ней подробнее.

— Почему бы и нет. С капиллярами нужно понять, что единственный тип капилляров, которые устойчивы в любых растворителях, которые не изнашиваются, не пережимаются, не деформируются — это стальные капилляры со стандартным внешним диаметром 1/16”. Пользуйтесь ими.

Их даже отрезать самому не надо. В продаже имеются капилляры стандартной длины 500 мм и 150 мм — этого вполне достаточно для работы.

— Но со сталью же приходится закручивать все соединения ключами, а фитинг отрезать специальным резак — что очень проблематично.

— Стоп, не путайте стальной капилляр и стальной фитинг. Сейчас Вы говорили именно о стальных фитингах, а не о капиллярах. Об этом чуть позже.

— Хорошо. Расскажите, как выбирать внутренний диаметр капилляра.

— Чем он меньше — тем меньше размывается хроматографическая зона (то есть меньше уширяются пики). Однако слишком узкие капилляры (где-то от 100 мкм и уже) сами по себе генерируют высокое давление, сравнимое с давлением, которое дает колонка.

Таким образом, компромисс заключается в следующем. При работе на колонках диаметром 4 и 4.6 мм, длиной 100 мм и более, внутренний диаметр капилляра от инжектора до колонки должен быть 150 мкм, а от колонки до детектора — 300 мкм. При работе на колонках диаметром 3 и 2 мм, а также на колонках диаметром 4 и 4.6 мм, длиной менее 100 мм, внутренний диаметр капилляра от инжектора до колонки должен быть 100 мкм, а от колонки до детектора — 150 мкм.

— На моем приборе с насосом ультравысокого давления были установлены капилляры диаметром 50 мкм, при этом применялись колонки диаметром 4.6 мм. И да, прибор даже без колонки генерировал огромное давление, на высоких скоростях потока работать было невозможно.

— Установка таких капилляров — это серьезная ошибка. Капилляры с диаметром 50 мкм нужны лишь для работы с капиллярными ВЭЖХ колонками диаметром 0.3 и 0.15 мм.

— Ясно. Переходим к фитингам?

— Ферулы из мягкой стали очень быстро деформируются и изнашиваются, особенно при частой замене колонок. И, как было верно подмечено, все соединения приходится закручивать ключами, а фитинг (точнее — опрессованную стальную ферулу) срезать специальным резак. Все это действительно проблематично.

Тем не менее, для соединения элементов внутри ВЭЖХ насосов и инжекторов применение полностью стальных фитингов совершенно оправдано. Именно тем, что в штатных ситуациях эти соединения не трогают. В насосе их раскручивают только при демонтаже головки, а инжекторе — при замене петли и при починке инжектора.

Поэтому в кране инжектора не должно быть никакого пластика, никаких пластиковых фитингов — только оригинальные стальные, которые идут в комплекте с краном.

А вот фитингов со стальной ферулой не должно быть ни в каких соединениях между инжектором и детектором. То есть для соединения колонки с инжектором и детектором, колонки и предколонки, колонок между собой — никаких стальных ферул.

— А ферулы из твердой стали?

— Это еще хуже, это самый плохой вариант из возможных. Ферулы из твердой стали, под короткий конус, нередко намертво смонтированные на нестандартном, тонком и ломком капилляре...

— Сразу менять?

— Чем быстрее, тем меньше мучений. Такие фитинги плохо уплотняют, уширяют пики, ферулы вечно застревают в колонке, опять же — надо крутить ключами каждый раз при замене колонки и с неясным итогом (уплотнится на этот раз, или нет), да еще и капилляр ломается.

— А что с пластиковыми фитингами?

— Цельные пластиковые РЕЕК фитинги я бы тоже не советовал применять. В принципе, нет ничего плохого в их применении в соединениях после колонки. Например, для соединения колонки с детектором, для соединения детекторов, для монтажа капилляра на слив и так далее.

Но для осуществления соединений, располагающихся между инжектором и детектором, я бы однозначно советовал применять отдельные фитинги со стальным зажимным винтом и пластиковой РЕЕК двуконусной ферулой.

— Мы уже обсуждали это, когда говорили о течах в жидкостной системе.

— Да. Но я повторю. Преимущество таких фитингов состоит в том, что они замечательно уплотняют все типы соединений. Такая ферула, в принципе, все-таки может застревать в соединениях, но существуют двуконусные ферулы со специальным механизмом, полностью исключающим этот недостаток.

Я предпочитаю пользоваться именно такими фитингами. Кроме качественного уплотнения, они обладают еще и другими преимуществами: пригодны до ультравысоких давлений (до 1000 бар) даже при затягивании вручную, из них вообще не выбивает капилляр. Затягивать их можно как вручную, так и при помощи специального инструмента.

— Как это — не выбивает капилляр? Вообще не может выбить?

— Может, конечно. Только при этом капилляр не вылетает из фитинга, брызгая подвижной фазой. Он остается в фитинге; при

выбивании слышится тихий щелчок, из-под фитинга начинает капать подвижная фаза — и все. Никаких больше происшествий.

Но выбивает капилляр из таких фитингов очень редко. А при их использовании в комбинации со стальными капиллярами — практически никогда.

— *Кстати, давайте вернемся к стальным капиллярам. Мне приходилось слышать мнение, что стальными капиллярами нельзя пользоваться в случае “био” разделений.*

— То есть протеомных приложений: белки, пептиды...

— *Именно так.*

— Да, “био” совместимые разделения — это модная тема и, вероятно, поэтому не вполне свободная от мифологии.

Объективная особенность протеомных разделений состоит в высокой вероятности загрязнения металлических поверхностей, соприкасающихся с пробой, компонентами пробы белковой природы. Что, естественно, приводит к перекрестному загрязнению проб (керри-оверу).

Как мы уже обсуждали, с этой проблемой можно до известного предела бороться, промывая все элементы инжектора “в семи водах”. Но бывает, что этого недостаточно, потому что проблема слишком велика. В таких случаях можно заменить часть стандартных элементов инжектора на “био-совместимые”. Или же полностью установить “био-совместимый” инжектор.

— *А чем состоит мифология?*

В том, что в первую очередь нужно заменить все капилляры. А в первую очередь, по-хорошему, следует поменять в автосамплере стандартную стальную иглу на стальную иглу, покрытую стеклом (или титаном). Следующий элемент за замену — стальная петля. Ее обычно меняют на пластиковую РЕЕК петлю. Если и это не помогает — придется тогда применять не стальной, а пластиковый РЕЕК инжектор.

И только где-то в конце по важности идут капилляры. Конечно, на всякий случай можно поменять и их. На просто РЕЕК, или на несколько лучший по свойствам РЕЕКsil. А в идеале — на стальной капилляр, покрытый изнутри РЕЕК (РЕЕК-lined SS tubing).

— *Какие еще будут советы?*

— Давайте рассмотрим все преимущества такого решения как приобретение отдельного ВЭЖХ насоса для вспомогательных операций.

— *Для промывки и кондиционирования колонок?*

— Да. Особенно много времени это экономит разработчику методик, которому часто бывает необходимо “держать под парами” сразу несколько колонок.

Но в лаборатории контроля качества (QC) этот прием также может использоваться, к примеру, для промывки предколонок. Одного отдельного насоса, я думаю, хватит для промывки предколонок для целого парка приборов. Можно даже каждый новый день ставить на каждую применяемую колонку свежую чистую предколонку. А отработанную ставить на промывку, на отдельный специальный насос. Такой вот “круговорот” предколонок.

— *Интересно. Существуют ли еще подобные хитрые приемы?*

— Конечно. Например, существенной экономии растворителей, а также времени, можно добиться грамотным применением системы рецикла подвижной фазы.

— *Это когда отработанная подвижная фаза (элюат) вместо слива перенаправляется обратно в емкость с подвижной фазой? Но ведь это приводит к быстрому загрязнению колонки. Или нет?*

— В том-то и дело — рецикл необходимо применять грамотно. Я же не говорю, что элюат необходимо сливать в емкость с подвижной фазой напрямую во время анализа реальной пробы. В этом случае выход детектора и емкость для подвижной фазы соединяют через специальный программируемый кран, который называется рециклером.

— *И как же он работает?*

— Подвижную фазу загрязняют, в первую очередь, вещества, которые элюируются в виде высоких пиков. Например, основные компоненты пробы. А примеси практически ничего не загрязняют. Поэтому во время элюирования низких пиков (примесей) элюат можно направлять не в слив, а обратно в емкость с подвижной фазой. Но во время элюирования высоких пиков (основных компонентов) элюат действительно необходимо направлять в слив.

Рециклер как раз и осуществляет такое перераспределение подвижной фазы. Электрическим соединением применяемый детектор подключается к рециклеру, в результате чего он также начинает “видеть” хроматограмму. Предельную высоту пика, после которого кран переключается с рецикла на слив, задает оператор.

— *Одним словом, этот приборчик позволяет экономить значительные объемы растворителей.*

— С одной поправкой — в изократическом режиме. Этим изократический режим и хорош для рутинных анализов. То есть он много чем хорош, но, в том числе, и возможностью работать с системой рецикла подвижной фазы.

— *А какова окупаемость рециклера?*

— Я думаю, что при условии постоянной загрузки — около двух месяцев при работе в обращенно-фазовом режиме. А при работе в гидрофильном режиме — вдвое-втрое быстрее.

— *Значит, кто хочет работать в гидрофильном режиме — должен бежать за рециклером?*

— Да. А лучше сразу приобретайте его вместе с прибором.

Но, вообще говоря, даже и при отсутствии рециклера грамотное применение рецикла все же возможно. Речь, прежде всего, о кондиционировании колонок. При промывке колонки элюат, разумеется, полностью направляют на слив, а вот при последующем

кондиционировании его можно перенаправить обратно в емкость с растворителем.

Учитывая, что кондиционирование может идти часы, применение рецикла в таких случаях позволяет экономить значительные объемы дорогостоящих растворителей. Этот способ экономии особенно выгоден при разработке методик, когда значительная часть подвижной фазы уходит, собственно, не на проведение анализа, а на кондиционирование колонки.

Курс 11. Курьезы в ВЭЖХ. Организационные и не классифицируемые ошибки

— *Вот мы, наконец, дошли до наиболее интригующего курса. Курьезные ситуации в ВЭЖХ — они вообще случаются часто?*

— К сожалению, нередко. Плохи, тем не менее, не сами эти курьезные случаи (ошибки — это вообще нормальная вещь в любой работе), а то, что в большинстве случаев сами люди относятся к ним очень спокойно. Никто не хватается за голову и не бежит исправлять критическую, по сути, ситуацию.

— *А зачем вообще приводить эти курьезные ситуации в отдельном курсе?*

— Потому что это реальные, практические ошибки, взятые из жизни. Которые совершают, но о которых никто не пишет. Даже в специальной литературе по траблшутингу. Хотя бы потому, что многие из этих ошибок очень сложно классифицировать. Это именно курьезы, ляпы, растраты средств.

Кроме того, рассмотрев все эти случаи, мы подойдем к одной важной мысли. О том, как со всем этим бороться.

— *А мы не нарушаем ничьих прав?*

— В отношении своих клиентов я соблюдаю полную конфиденциальность — как и требуют условия договора.

Все приводимые ниже ситуации я наблюдал лично в меньшинстве случаев, а в большинстве слышал их от своих коллег. Никаких данных

об этих организациях и людях, естественно, я не привожу. Да и смысл курса состоит не в том, чтобы “выносить сор из избы”, а в том, чтобы предостеречь людей от повторения подобных ошибок.

Наверное, даже не очень важно — было ли все это на самом деле. Важно то, что это вполне могло бы быть правдой.

— *Хорошо, начнем.*

— Давайте для начала расскажу историю о невоспроизводимости времени удерживания. Представьте совсем небольшую лабораторию, заставленную приборами. Два ряда столов с расстоянием примерно в метр. На одной стороне в ряд стоят газовые хроматографы, напротив них — жидкостные. Рядом с жидкостными хроматографами — окно. Зима. Термостатов у жидкостных хроматографов нет.

— *Картина прямо-таки апокалиптическая. Причина колебаний удерживания — в нестабильности температуры?*

— Да, разброс температур просто огромен. Каждые полчаса открывают печь газового хроматографа. Стоит страшная жара, жаром дышит прямо на колонку. Для охлаждения открывают окно — холодный ветер дует прямо на колонку. Так делать не надо, конечно. Жидкостные хроматографы должны находиться в отдельном кондиционируемом помещении, и желательно иметь термостат для колонок.

Вот другая история — о том, что капилляр постоянно выбивает, и поэтому невозможно работать на давлении выше 80 (!) бар.

— *Это же очень низкое давление... Большинство разделений будут идти десятки минут!*

— Да, порядка получаса-часа. А дело вот в чем. Штатный термостат вышел из строя, и вместо него купили дешевый контактный термостат под 300 мм колонки — то есть этот термостат достаточно длинный. Конструкция термостата не очень удачная — колонку нужно монтировать на короткий (около 50 мм) отрезок РЕЕК капилляра. С помощью самого дешевого РЕЕК фитинга.

Все бы еще ничего, но и расположение самого термостата очень странное. Приборы стоят на столе очень плотно. Между ними есть небольшой промежуток, куда и поместили термостат — входом колонки к стенке. Монтировать колонку было нужно вслепую, одной рукой. Вытянув ее, что есть сил. Признаюсь — я тоже попробовал. У меня выбило капилляр на 120 бар.

Разумеется, схему жидкостной линии здесь необходимо менять.

— *Вот это действительно курьез.*

— Конечно. Хотя, существуют и более простые способы нерационального использования времени. Например, можно поместить лабораторию пробоподготовки и комнату с приборами на разных этажах в разных крыльях огромного здания. Это я тоже видел сам, и неоднократно.

— *Вся работа заменяется бегом по лестницам?*

— И по коридорам. С бутылками с подвижной фазой и пробами в руках. Кое-где все перевозят в специальных тележках и на лифте. Но чаще — в руках и по лестницам.

Любые перемещения вообще необходимо минимизировать. При возможности, все манипуляции с подвижной фазой и пробами должны осуществляться в одной комнате, просторной и оборудованной вытяжкой.

— *А бывают примеры нерациональных денежных затрат?*

— Конечно, бывают. Как правило, в основе всех нерациональных денежных затрат лежит одна идея — сэкономить там, где экономить никак нельзя.

— *Принцип, когда скупой платит дважды.*

— Именно так. Причем чаще всего экономят на квалифицированном персонале, качественных расходных материалах.

Вот хорошая история “экономии” на качественных стандартах, которая закончилась плачевно. Необходимо было внедрить методику определения субстанции, стандарт которой стоил достаточно дорого. Вообще говоря, не так уж и дорого — но денег все-таки пожалели, а субстанцию купили с рук “у знакомых”. Что ни делают — не видят пика этого вещества. Закупили множество различных дорогих колонок на круглую сумму — ничего не помогает. И полтора года занимались такой вот “разработкой” — пока не купили наконец настоящий стандарт. И тогда обнаружилось, что с рук им продали, видимо, какую-то неорганическую соль.

— *Какой детективный случай!*

— Да, случай занимательный. Правда, есть истории менее яркие, но при этом значительно сильнее поражающие растрчиваемыми суммами.

Вот хороший случай “экономии” на разработке методики, или на позиции разработчика методики — как хотите. Нужно было определять изоформы некоторого белка. Условия разделения взяли из литературы. Заказали такую же колонку, как и в статье. Разделение более-менее получалось, но колонка выходила из строя буквально за недели две — адсорбент просто вытекал из нее. Либо эта колонка была бракованная, либо методика такая странная была — толком не известно. Зато известно, что стоила колонка больше двух тысяч долларов.

— *Да, обидно. Две тысячи — это немалая потеря, но не такая уж и поражающая воображение.*

— А история на этом только начинается. Никто так и не подумал о разработке новой методики. Покупали все те же колонки, и они так же выходили из строя. Всего за полтора года было куплено... считайте сами.

— *Фантастика.*

— Информация из вторых рук, но зато очень надежных. Я ей верю. Вообще, брать “готовые” методики из литературы, какой бы авторитетной она ни была, и внедрять их без всесторонней проверки, валидации — это верный путь к низкому качеству анализа и денежным растратам. Иногда в этих методиках такое написано, что это повергает в шок.

— *Вспомните какой-нибудь пример такой методики.*

— Могу привести сразу несколько. Не раз я видел методики, в которых в подвижную фазу добавляли одновременно анионную и катионную ион-парные добавки, и еще триэтиламин.

— *Они перепутали подвижную фазу с супом?*

— Видимо. Смесь ион-парных добавок, в принципе, я могу объяснить тем, что “разработчик” не понимает, что в ионной хроматографии удерживание определяется суммарным зарядом соединения, а не отдельными группами, которые, возможно, имеют различный по знаку заряд. И добавляет смесь добавок в надежде, что хоть что-то работает.

— *А триэтиламин?*

Нет никакого смысла добавлять триэтиламин как модификатор, если в подвижной фазе уже есть ион-парная добавка. Она замечательно справится с модифицированием и без триэтиламина.

Или вот еще “замечательный” пример — применение ион-парной хроматографии на полимерной (нейтральной полистирольной) колонке. Примечательно, что к таким чудо-методикам даже не прикладывают хроматограмм.

— *А что здесь не так?*

— Нейтральная полистирольная колонка — сама по себе не сахар, поэтому на ней и работают редко. Пакуются они тяжело, упаковки нестабильные. Массообмен затруднен, соответственно, эффективность невысокая, асимметрия значительная. А тут еще вдобавок — ион-парная добавка. Думаю, что все пики там имеют вид широких прямоугольных треугольников.

Да и бессмысленно это совершенно. Зачем на колонки с нейтральным полистиролом наносить гексан сульфонат, если существуют колонки с сульфированным полистиролом? Которые, к тому же, значительно эффективнее и имеют значительно более стабильную упаковку?

— Может, “разработчики” об этом не знают?

— Или берут ту колонку, которая лежит в ящике стола.

Или не знают ничего, кроме обращенно-фазовой хроматографии. Например, необходимо определить чрезвычайно полярное соединение, которое ну никак не удерживается на обращенной фазе. И вместо того, чтобы использовать другой режим — начинается ожесточенная борьба за удерживание в обращенно-фазовом режиме.

— И дальше — соль?

— Да, много соли, 100 мМ фосфатный буфер и еще хлорид натрия в нагрузку. Колонка забивается солью за несколько дней. Спрашивают меня — что делать. Промывать теплой водой — что же тут еще делать. На несколько часов помогает. Потом опять надо промывать. А через месяц — менять колонку на новую.

— А почему бы не разработать хорошую методику?

— Стандартный ответ — мы работаем по утвержденной методике, и ничего не можем с этим сделать.

Со старыми “утвержденными” методиками вообще часто доходит до смешного (если бы не было так грустно). Мне рассказывали об аналитическом разделении на метровой (!) колонке с 10 мкм адсорбентом. Страшно представить — какого года была методика, чтобы в ней фигурировала такая колонка. Начала семидесятых годов? То есть методике, должно быть, лет сорок-сорок пять, не меньше.

— Это вообще нормально?

— Это совершенно ненормально. Даже, к примеру, у патента есть “срок годности”. У аналитической методики он должен быть тем более.

Хотя, чтобы разработать морально устаревшую методику, совершенно необязательно жить сорок лет назад. Можно разработать устаревшую методику прямо сегодня.

И даже существует такая упадническая философия — специально разрабатывать плохие методики с применением плохих колонок. Вы можете догадаться — почему?

— *Чтобы другие люди с плохими колонками могли ее воспроизвести?*

— Совершенно верно, идею регресса Вы понимаете вполне.

— *А что с подготовкой пробы? Там бывают курьезы?*

— Еще какие. Вот история про растворение образцов (а именно — таблеток) в... мерной колбе.

— *Как это? Объем же будет совершенно неверным! Или они полностью растворяются?*

— Да нет, это обычные таблетки. Представьте, весь раствор мутный от взвеси мела, осадок мела — на четверть мерной колбы. И ни у кого нет никаких возражений. Как будто мерная колба как раз и предназначена для растворения таблеток, а вовсе не для приготовления раствора точного объема.

— *И как бороться со всеми этими ошибками и курьезами?*

Хроматография — очень молодая область аналитической химии. И в ней достаточно много тонких моментов, особенно в области ее прикладного применения на производстве. По причине относительной молодости и сложности в хроматографии еще не успели сформироваться профессиональные стандарты качества.

Все перечисленные выше “курьезы”, на самом деле, лечатся только наличием профессиональных стандартов, которые специалисты должны воспринимать с самых ранних этапов своей карьеры.

ВЭЖХ курсы

1. Общий курс ВЭЖХ. Разработка ВЭЖХ методик. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик
2. Современные тренды в разработке новых фармацевтических приложений
3. Решение проблем при трансфере ВЭЖХ методик
4. Применение метода ВЭЖХ в лабораториях ОКК. Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик
5. Курс ВЭЖХ для регистраторов лекарственных средств

Экспертиза и трансфер ВЭЖХ методик

1. Экспертное исследование ВЭЖХ методики
(пригодность, сложность трансфера, экономическая эффективность)
2. Трансфер ВЭЖХ методики на оборудование исполнителя
(подбор ВЭЖХ колонки под данную ВЭЖХ методику, проверка пригодности методики, выдача протокола валидации специфичности разделения)
3. Оптимизация фармакопейной ВЭЖХ методики
(с целью повышения экономической эффективности, точности) в рамках, допустимых фармакопей

Помощь при GMP аудите аналитической лаборатории

1. Проверка готовности к GMP инспекции аналитической лаборатории
2. Помощь при GMP инспекции аналитической лаборатории

Квалификация ВЭЖХ оборудования

1. Квалификация ВЭЖХ оборудования
2. Разработка СОП квалификации оборудования. Обучение квалификации оборудования

Разработка ВЭЖХ методик и проведение исследований методом ВЭЖХ

1. Разработка аналитических ВЭЖХ методик
2. Разработка хиральных ВЭЖХ методик
3. Разработка препаративных ЖХ методик выделения/очистки
4. Проведение исследований хроматографическими и спектральными методами

ВЭЖХ продукты компании IBS

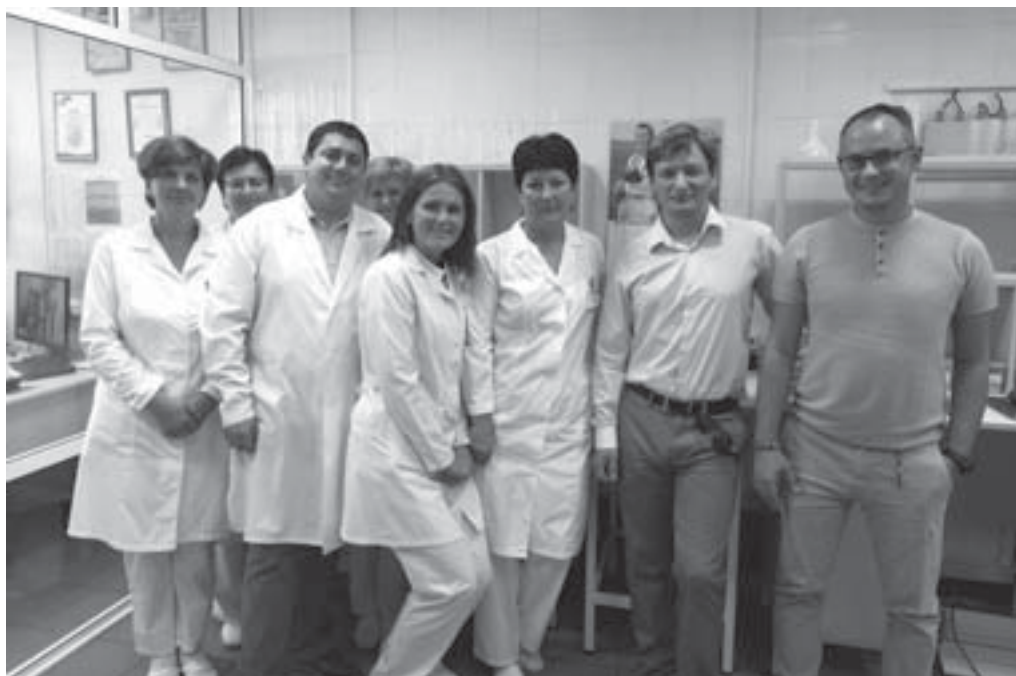
1. Готовые ВЭЖХ решения для анализа фармацевтической, пищевой и агрохимической продукции *IBS Pharm* и *IBS Nutri*
2. ВЭЖХ оборудование *Shimadzu* с готовыми ВЭЖХ решениями *IBS Pharm* и *IBS Nutri*
3. ВЭЖХ оборудование *Shimadzu* с проведенным трансфером фармакопейных и иных ВЭЖХ методик

ВЭЖХ курсы компании IBS

www.hplc.today/rus, sales@hplc.today

Мы проводим корпоративные и локальные ВЭЖХ курсы уже более семи лет, и достаточно хорошо известны на российском рынке. С момента запуска обучения было прочитано 22 корпоративных и более 30 локальных курсов, обучено более 400 специалистов 56 компаний.

Основными заказчиками ВЭЖХ курсов являются фармацевтические и биотехнологические компании, а также исследовательские и обра-



Автор курсов (второй справа) с коллективом лаборатории ООО «Франдеса»

зовательные центры. Тем не менее, большим успехом они пользуются и у компаний с иным профилем деятельности: пищевых, агрохимических, энергетических и нефтехимических.

Мы не просто передаем участникам курсов свой опыт, а выводим их на принципиально иной, более глубокий уровень понимания процессов и закономерностей; помогаем не только разрешить текущие, наиболее острые проблемы, но и показываем возможности улучшений там, где их даже не ожидали увидеть.

«На пути к лучшей хроматографии» — этот девиз мы относим как к себе, так и к нашим заказчикам. Это хороший путь, достойный профессионалов.

Константин С. Сычев,
к.х.н., автор курсов, директор
Integrated BioSeparation Solutions OU,
www.hplc.today/rus

Общий курс ВЭЖХ. Разработка ВЭЖХ методик. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик

3 дня: лекции, или

5 дней: лекции и практическая часть

Корпоративный курс «Общий курс ВЭЖХ. Разработка ВЭЖХ методик. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик» является флагманским ВЭЖХ курсом компании; он читается на протяжении семи лет, его прослушали более 200 специалистов из более чем 30 компаний.

В отличие от других курсов, дающих отрывочные, плохо связанные между собой знания, данный курс дает целостную картину метода ВЭЖХ, который включает в себя более двух десятков возможных аналитических подходов, основанных на различных адсорбционных, эксклюзионных и смешанных режимах.

Курс предполагает, что за короткое время его слушатель научится:

- предсказывать поведение любого целевого соединения в любом ВЭЖХ режиме,
- пользоваться широким спектром ВЭЖХ колонок, правильно подбирая их под поставленную задачу,
- выбрать оптимальные скорость потока, длину колонки и диаметр частиц адсорбента,

- быстро оценивать качество разделения и находить слабые места в сторонних методиках,
- понимать логику разработки методик, использовать ее в трансфере и валидации.

Курс может дополнительно включать 2 дня практикума, и именно в таком виде он приобрел наибольшую популярность. Секрет успеха 5-дневного формата заключается в том, что в течение 2 дней практикума авторы курса со слушателями стабильно разрабатывают по 2–3 оригинальных ВЭЖХ разделения, что фактически окупает все затраты. И это учитывая тот факт, что работа, как правило, ведется над наиболее проблематичными задачами, решить которые ранее своими силами участникам не удавалось.

Курс проводится на территории заказчика. Программу можно скорректировать с учетом специфики задач лаборатории. Количество участников не ограничено. Двухдневный практикум позволяет проводить разработку, трансфер, валидацию ВЭЖХ методик в режиме реального времени.

Современные тренды в разработке новых фармацевтических приложений

2 дня: лекции

Основная задача этого курса состоит в том, чтобы вывести разработчика ВЭЖХ методик за рамки канвы решений, характерных для 80-х годов прошлого века, в течение которых было создано большинство фармакопейных методик.

Слушатели курса получают представление о полном спектре современных прикладных подходов в ВЭЖХ, позволяющих повысить экономическую эффективность и качество разрабатываемых, а также оптимизируемых в процессе трансфера ВЭЖХ методик.

Отдельное место в курсе занимает разбор ряда «привычных», но при этом архаичных решений и подходов, ограничивающих разработчика в своей профессиональной деятельности. Ведь главный принцип разработки гласит, что методика должна создаваться исходя из специфики задачи, а не исходя из решений, к которым привык аналитик.

Решение проблем при трансфере ВЭЖХ методик

5 дней: лекции и практическая часть

Фармацевтические предприятия часто сталкиваются с тем, что методики анализа фармацевтических субстанций или лекарственных форм, полученных от поставщиков, взятых из литературных источников или из фармакопеи, воспроизводятся плохо, или не воспроизводятся совсем.

В большинстве случаев методики не воспроизводятся по причине отличия фактических условий анализа, однако в ряде случаев они могут быть изначально нерабочими, фиктивными.

Новый корпоративный курс-практикум «Решение проблем при трансфере ВЭЖХ методик» позволяет в короткие сроки отработать прикладные навыки трансфера ВЭЖХ методики — от анализа ее исходного текста до диагностики проблем и выполнения корректирующих действий.

В курсе рассмотрены подходы и для значительной коррекции методик (в рамках, допустимых фармакопей), и для тонкой настройки хроматографической системы для достижения требуемых параметров: разрешения, симметрии пиков и чувствительности.

70 % курса занимает прикладная часть курса. «Подводные камни» трансфера ВЭЖХ методик в обращенно-фазовой, ион-парной, гидрофильной (HILIC) и ионной хроматографии разбираются на конкретных примерах в режиме реального времени.

Курс будет интересен специалистам лабораторий исследований и разработок, лабораторий ОКК фармацевтических предприятий, а также лабораторий контроля качества лекарственных средств.

Практическое владение подходами к решению проблем при воспроизведении ВЭЖХ методик позволяет предприятиям существенно ускорять сроки и снижать риски при постановке на производство и регистрацию новых препаратов.

Курс проводится на территории заказчика. Программу можно скорректировать с учетом специфики задач лаборатории. Количество участников не ограничено.

**Применение метода ВЭЖХ в лабораториях ОКК.
Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок.
Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик**

2 дня: лекции

Корпоративный курс «Применение метода ВЭЖХ в лабораториях ОКК. Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик» обновлен в 2018 году; он основан на двух ранее отдельных курсах, которые читались на протяжении более пяти лет.

Курс включает в себя ответы на наиболее актуальные вопросы, возникающие в процессе ежедневной работы в любой лаборатории ОКК. Дополнительную остроту поднимаемым в курсе темам придает существование в этой области огромного числа мифов, многие из которых до сих пор успешно поддерживаются как поставщиками оборудования и колонок, так и многими авторитетными печатными источниками и авторами курсов.

По отзыву одной из слушательниц, «все, что Вы говорите, подтверждается нашими наблюдениями, и идет полностью вразрез со всем, что мы когда-либо слышали от сервис-инженеров и на других курсах».

Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок приводит к огромной экономии средств вследствие сокращения непроизводительных издержек, а корректно проводимые трансфер и валидация значительно сокращают время внедрения новых аналитических методик.

Данный курс будет интересен не только сотрудникам лабораторий ОКК, но и регистраторам лекарственных средств. Курс проводится на территории заказчика. Программу можно скорректировать с учетом специфики задач лаборатории. Количество участников не ограничено.

**Стандартная программа курса «Общий курс ВЭЖХ.
Разработка ВЭЖХ методик. Основы трансфера
и валидации ВЭЖХ методик»**

1. Специфичность ВЭЖХ методики. Специфичность хроматографического разделения и специфичность детектирования.

2. Обзор способов детектирования в ВЭЖХ. Оптические, испарительные, электрохимические и масс-селективные детекторы, их специфичность и области применения. В каких случаях, и каким образом оптимизируют условия детектирования.

3. Классификация хроматографических методик согласно их назначению. Таргетные и нетаргетные методики. Изократический и градиентный способы элюирования.

4. Основные параметры ВЭЖХ разделения. Факторы, определяющие разрешение пары пиков.

5. Оптимальное удерживание. Оптимальная селективность. Оптимальная эффективность.

6. Три этапа разработки ВЭЖХ методики.

7. Базовые адсорбционные (RP, NP, HILIC, IC, CT, LEC) и эксклюзионные (SEC, IEX) режимы жидкостной хроматографии.

8. Смешанные режимы, часто применяющиеся при анализе фармацевтиков: RP/HILIC, RP/IC, RP/CT, RP/SEC, HILIC/IC, NP/CT.

9. Прогнозирование хроматографического поведения соединения в каждом из хроматографических режимов по его структурной химической формуле.

10. Прогнозирование порядка элюирования в базовых и смешанных режимах, часто применяющихся при анализе фармацевтиков.

11. Обратенно-фазовый (RP) механизм удерживания. Регулирование удерживания и селективности в обратенно-фазовом режиме. Преимущества и недостатки обратенно-фазовой хроматографии.

12. Нормально-фазовый (NP) и гидрофильный (HILIC) механизмы, их сходства и различия. Регулирование удерживания и селективности в нормально-фазовом режиме. Преимущества и недостатки нормально-фазовой хроматографии.

13. Регулирование удерживания и селективности в гидрофильном (HILIC) режиме. Мифы, связанные с гидрофильным режимом. Как разработать робастное гидрофильное разделение.

14. Ионный (IC) механизм удерживания. Регулирование удерживания и селективности в ионном режиме. Преимущества и недостатки ионной хроматографии. Как разработать МС-совместимую методику в ионном режиме.

15. Обзор коммерчески доступных неподвижных фаз для ВЭЖХ.

16. Современные тренды в разработке неподвижных фаз для ВЭЖХ. НФ для работы в смешанных режимах. Поверхностно-пористые НФ, их преимущества и недостатки.

17. Тестирование ВЭЖХ колонок. Измерение их эффективности, химической инертности, величины удерживания по доминирующему механизму и типа проявляемой селективности. Тесты для обращенно-фазовых и гидрофильных/ионных НФ.

18. Подбор ВЭЖХ колонки, «аналогичной данной».

19. Теория скоростей и уравнение Ван-Деемтера. Гидродинамика ВЭЖХ колонки и закон Дарси.

20. Как выбрать оптимальную скорость потока. Эффективность-оптимальная, средневзвешенная и производительность-оптимальная скорости потока.

21. Как выбрать оптимальную длину колонки и размер частиц.

22. Обеспечение прослеживаемости ВЭЖХ измерения. Основы трансфера ВЭЖХ методик.

23. Основы валидации ВЭЖХ методик. Валидационные характеристики.

24. Неоднозначная зависимость успеха валидации ВЭЖХ методики от выполнения критериев пригодности хроматографического разделения.

25. Взаимосвязь валидационных характеристик. Правильность как комбинация специфичности, линейности и прецизионности. Связь правильности и предела определения с нижней границей рабочего диапазона.

26. Различные способы установления специфичности определения. День 4 и 5: Практикум: разработка и оптимизация ВЭЖХ методик.

Пример специального ВЭЖХ курса для регистраторов лекарственных средств

1. Специфичность ВЭЖХ методики. Специфичность хроматографического разделения и специфичность детектирования.

2. Обзор способов детектирования в ВЭЖХ. Оптические, испарительные, электрохимические и масс-селективные детекторы, их специфичность и области применения. В каких случаях, и каким образом оптимизируют условия детектирования.

3. Классификация хроматографических методик согласно их назначению. Таргетные и нетаргетные методики. Изократический и градиентный способы элюирования. ВЭЖХ системы с переключением потоков и многомерная ВЭЖХ.

4. Основные параметры ВЭЖХ разделения. Факторы, определяющие разрешение пары пиков. Хроматографическая система. Химические и технические параметры ВЭЖХ разделения.

5. Оптимальное удерживание. Оптимальная селективность. Оптимальная эффективность.

6. Базовые адсорбционные (RP, NP, HILIC, IC, CT, LEC) и эксклюзионные (SEC, IEX) режимы жидкостной хроматографии.

7. Смешанные режимы, часто применяющиеся при анализе фармацевтиков: RP/HILIC, RP/IC, RP/CT, RP/SEC, HILIC/IC, NP/CT.

8. Обзор коммерчески доступных неподвижных фаз (НФ) для ВЭЖХ. НФ для работы в базовых и смешанных режимах.

9. Современные неподвижные фазы для ВЭЖХ. Понятие о качестве неподвижной фазы и качестве ВЭЖХ колонки. Химическая инертность НФ. Поверхностно-пористые НФ: преимущества и недостатки.

10. Влияние правильности кондиционирования ВЭЖХ колонок на успех воспроизведения ВЭЖХ методик.

11. Влияние правильности сборки жидкостной системы хроматографа на успех воспроизведения ВЭЖХ методик. Коррекция эффективности и симметрии разделения путем выбора надлежащих капилляров и фитингов. Проблемы, возникающие при применении коротких ВЭЖХ колонок.

12. Коррекция селективности разделения в режиме градиентного элюирования путем внесения изменений в жидкостную систему хроматографа.

13. Влияние настроек разметки и интегрирования на воспроизводимость результатов ВЭЖХ измерения.

14. Обеспечение прослеживаемости ВЭЖХ измерения. Основы трансфера ВЭЖХ методик.

15. Основы квалификации ВЭЖХ оборудования

16. Квалификация протокола обработки данных. Различия в расчете параметров разделения (отношение сигнал/шум, эффективность, асимметрия, разрешение) по стандартному набору формул и формулам EP/USP.

17. Тестирование ВЭЖХ колонок. Измерение их эффективности, химической инертности, величины удерживания по доминирующему механизму и типа проявляемой селективности. Тесты для обращенно-фазовых НФ.

18. Основы валидации ВЭЖХ методик. Валидационные характеристики. Специфичность. Протокол валидации специфичности. Различные способы установления специфичности определения.

19. Робастность. Особенности валидации робастности. Протокол валидации робастности. Упущения при валидации робастности как одна из основных причин отсутствия воспроизводимости ВЭЖХ методик.

20. Подтверждение линейности. Определение пределов обнаружения/определения. Способы уменьшения пределов обнаружения/определения.

21. Критерии пригодности хроматографического разделения. Неоднозначная зависимость успеха валидации ВЭЖХ методики от выполнения критериев пригодности хроматографического разделения. Как на практике выглядит пригодное ВЭЖХ разделение.

22. Взаимосвязь валидационных характеристик. Правильность как комбинация специфичности, линейности и прецизионности. Связь правильности и предела определения с нижней границей рабочего диапазона.

**Порядок проведения квалификации ВЭЖХ
оборудования специалистами компании IBS**
www.hplc.today/rus_sales@hplc.today

Обозначения:

Обычный шрифт — стандартная процедура.

Курсив — опциональная процедура.

Operational Qualification

Насосная система

1. Точность задания скорости потока (на одной скорости / *трех скоростях потока*).
2. Стабильность потока (по временам удерживания, на одной скорости / *трех скоростях потока*).
3. *Линейность скорости потока.*

В т.ч. **градиентная система** (если есть в наличии):

4. Точность задания градиента (один шаг / *различные шаги*).
5. Время задержки градиента.
6. *Повторяемость времени элюирования в градиентном режиме.*

Детектор УФ

7. Точность установки длины волны (диодно-матричный / *одно- или мультиканальный*).
8. Шум. 9. Дрейф. 10. Предел определения. 11. *Линейность.*

Инжектор автоматический

12. Повторяемость инжектирования
13. Точность инжектирования
14. Линейность инжектирования
15. Керри-овер (стандартное вещество и стандартная промывка / нестандартное вещество и нестандартная промывка).

Инжектор ручной

12. Повторяемость инжектирования.
13. Точность инжектирования.
14. Линейность инжектирования.
15. Керри-овер (стандартное вещество и стандартная промывка / нестандартное вещество и нестандартная промывка).

Жидкостная система

16. Качество сборки жидкостной системы.

Термостат колонки

17. Точность установки температуры (по центру / в трех точках)
18. Стабильность поддержания температуры

Термостат автосамплера

19. Точность установки температуры, нагревание
20. Точность установки температуры, охлаждение

Performance Qualification

Проверка протокола обработки данных

1. Проверка способа расчета разрешения
2. Проверка способа расчета асимметрии
3. Проверка способа расчета эффективности
4. Проверка способа расчета отношения сигнал/шум в стандартных / нестандартных условиях хроматографирования

Тестирование обращенно-фазовых ВЭЖХ колонок

1. Стандартный тест на эффективность (качество упаковки)
2. Измерение относительной величины гидрофобности
3. Установление типа химии обращенной фазы по двухпараметровому тесту селективности
4. Установление относительной величины химической инертности

Тестирование ВЭЖХ колонок для гидрофильной / ионной хроматографии на основе силикагеля

1. Стандартный тест на эффективность в нормально-фазовом режиме (качество упаковки)
2. Перевод ВЭЖХ колонки в гидрофильный/ионный режим хроматографии
3. Измерение относительной величины гидрофильности (удерживания в гидрофильном режиме)
4. Установление знака и относительной величины электрического заряда неподвижной фазы
5. Тест на эффективность в гидрофильном режиме
6. Тест на эффективность анионита в ионном режиме
7. Тест на эффективность катионита в ионном режиме

Процессы, оцениваемые экспертом компании IBS при проверке готовности аналитической лаборатории к GMP инспекции

www.hplc.today/rus, sales@hplc.today

Приведенный ниже список содержит перечень процессов в аналитической лаборатории, которые могут быть проверены экспертом при проведении полной проверки готовности аналитической лаборатории к GMP инспекции. Тем не менее, в каждом конкретном случае план проведения проверки специально оговаривают с заказчиком, а проверку проводят по заранее утвержденному плану.

Работа по пунктам 1–9 проводится удаленно; работа по пункту 10 проводится при личном визите эксперта в аналитическую лабораторию.

1.0 Общая информация

- 1.1 Адрес, мейл, телефон контактного лица.
- 1.2 Сертификат национальной аккредитации (если имеется).
- 1.3 Имеются ли анализы, выполняемые на аутсорсинге? Если да, будут запрошены контрактные договора.

2.0 Система качества

- 2.1 Проводятся ли внутренние аудиты? С какой частотой, кем? Как осуществляются корректирующие действия? Если да, то будет запрошен последний отчет.
- 2.2 Имеется ли СОП на “Out of specification/Out of trend results” и на “Deviations”? Будет запрошена документация на одно или несколько исследований.

- 2.3 Как осуществляется “Change control”?
- 2.4 Как проходит обучение и квалификация работников? Будет запрошена документация, в частности, план обучения и СОП. Каким образом проверяется эффективность обучения?
- 2.5 Имеется ли СОП на валидацию аналитических методик? Определены ли критерии приемлемости на каждый раздел валидации? Будут запрошены один или несколько отчетов валидации и проверено его/их соответствие СОПу. Кто подписывает отчеты о валидациях? Где хранятся хроматограммы?

3.0 Документация

- 3.1 Имеются ли спецификации на каждый тестируемый продукт?
- 3.2 Как обеспечивается контроль того, чтобы лаборанты работали по текущей версии СОПа? (в случае фармакопейной методики — по текущей фармакопее?)
- 3.3 Будут запрошены следующие СОПы: на отбор проб исходных материалов, общие требования к хроматографическому анализу, инструкции по работе с оборудованием, запись в лабораторном журнале, хроматографические колонки, стандарты, реагенты, растворы, сохраненные образцы, получение и запись лабораторных образцов, тесты на устойчивость, результаты вне спецификаций, отклонения, чистка лабораторной посуды, техники безопасности, валидации аналитических методик, тренинг персонала и т.д.
- 3.4 Будут запрошены несколько аналитических методик. Будет оценено насколько детально и доступно описаны процедуры.
- 3.5 Будет проверено наличие журналов аналитического оборудования, и как они ведутся.
- 3.6 Как регистрируются входящие образцы? Есть ли возможность отследить, где находится образец в данное время?
- 3.7 Кто проверяет лабораторные журналы? Прошел ли он/она соответствующую квалификацию? Как хранится “raw data”, например, хроматограммы?

4.0 Помещения и оборудование

- 4.1 Проводится ли мониторинг температуры и влажности в лабораторных помещениях?
- 4.2 Проводится ли мониторинг температуры/влажности критических зон и оборудования, например камер для проверки на устойчи-

- вость, холодильников и т.д.? Имеется ли система сигнализации на случай отклонения от заданных параметров?
- 4.3 В каких условиях хранятся образцы, реагенты и стандарты?
- 4.4 Имеется ли список/файл основного оборудования? Будет проверено наличие наклеек четко определяющих статус приборов.
- 4.5 Как и кем осуществляется обслуживание оборудования? Производится ли превентивное обслуживание? Если да, то с какой частотой? Соответствует ли СОПу? Документируется ли обслуживание в журнале оборудования?
- 4.6 Имеется ли у каждого работника свой персональный вход в программу контролируемую ВЭЖХ/ГХ? Какие привилегии имеются у лаборантов, руководителя лаборатории и т.д.? Как осуществляется бэкап? Имеется ли соответствующая процедура?
- 4.7 Как моется лабораторная посуда? Валидирован ли процесс? Если да, будет запрошен отчет о валидации.

5.0 Материалы

- 5.1 Имеется ли файл/список лабораторных реагентов? Имеется ли сертификат анализа и паспорт безопасности на каждое вещество?
- 5.2 Как производится учёт и контроль за реагентами? Наклейки, фиксируется ли дата получения, открытия контейнера, выбрасывания, как определяется срок годности? Соответствует ли написанному в СОПе? Хранятся ли сертификаты утилизированных реагентов?
- 5.3 Как хранятся стандарты? Имеется ли мониторинг и сигнализация в местах их хранения? Какие типы стандартов используются (первичные, рабочие и т.д.)? Какие тесты производятся для квалификации рабочих стандартов? Если соответствующий СОП? Каким образом определяется “potency” стандарта? Будет запрошен отчет о квалификации одного или нескольких стандартов.
- 5.4 Какая вода используется для приготовления растворов в лаборатории и для приготовления мобильных фаз для ВЭЖХ? Если имеется аппарат по производству воды, каким образом осуществляется мониторинг ее качества? Будет запрошен отчет о квалификации.
- 5.5 Как долго хранятся растворы? Зависит ли срок хранения от типа раствора? Понятно ли они обозначены? Соответствует ли обозначение и сроки годности СОПу?

6.0 Образцы

- 6.1 Как осуществляется отбор образцов для анализа (исходные материалы, промежуточные, конечный продукт)? В какие контейнеры? Определены ли наклейки? Определено ли специальное место для отбора? Кто авторизован осуществлять отбор? Есть ли процедура очистки после отбора? Имеется ли соответствующий СОП?
- 6.2 Как определяются количества вещества/продукта для отбора?
- 6.3 Отбираются ли сохраненные образцы? Как долго они хранятся? Какое количество отбирается? В какие контейнеры и с какими наклейками? Соответствует ли это СОПу, если таковой имеется?
- 6.4 Как долго хранятся образцы перед анализом? В каких условиях? Имеется ли мониторинг температуры?

7.0 Анализ

- 7.1 Как тестируются исходные материалы? Будут запрошены аналитические процедуры и спецификации. Какова общая политика тестирования: идентификация или полный монограф? Где это записано? Есть ли процедура по утверждению поставщиков исходных материалов? Проводился ли аудит у этих поставщиков? Если да, то будет запрошен один из отчетов.
- 7.2 На какой стадии отбирается конечная продукция для анализа? Какие тесты имеются для конечной упаковки? Как определяется репрезентативное количество образцов из серии?
- 7.3 Какова политика отбора и анализа промежуточных образцов и образцов в процессе?
- 7.4 Как осуществляются проверки на устойчивость конечной продукции? Имеется ли мониторинг и сигнализация на камеры? Калиброваны ли сенсоры температуры и влажности? Будет запрошен отчет о калибровке. Имеется ли журнал у каждой камеры? Ведётся ли учёт входящих и исходящих образцов? Будет запрошен один ли несколько протоколов и отчётов по устойчивости. Является ли методика проверки на устойчивость “stability indicating”? Будет запрошен отчет о валидации одной или нескольких методик.
- 7.5 Как производятся титрации? Визуально или с помощью автоматического титратора? Если визуально, были ли персонал обучен? Задokumentировано ли это? Есть ли СОП по приготовлению растворов индикаторов?

- 7.6 Измеряется ли содержание влаги в образцах методом Карла Фишера? Если да, как определяется титр? Есть ли СОП?
- 7.7 Как тестируется рН и проводимость? При какой температуре? Имеется ли автоматическая регулировка температуры?
- 7.8 Как контролируется температура при измерениях показателя преломления и относительной плотности?

8.0 Результаты тестов

- 8.1 Кто проверяет записи в лабораторном журнале? Квалифицирован ли он/она? Каким образом была проведена квалификация?
- 8.2 Имеется ли LIMS? Если да, валидирован ли он? Кто авторизован пользоваться и на каком уровне?
- 8.3 Имеется ли СОП на результаты вне спецификаций? Будут запрошены одно или несколько расследований и проверено на соответствие СОПу. Не происходит ли “testing into compliance”? На каком этапе задействован отдел обеспечения качества (QA)? Как и кем определяется количество репликатов в случае повторного анализа? В каких случаях проводится повторный отбор? Кто принимает решение об отмене первоначальных результатов? В случае лабораторной ошибки, какие предотвращающие действия проводятся? Кто контролирует их исполнение?
- 8.4 Имеется ли СОП на обработку и округление численных результатов? Будет проверено как “raw data” переходит в результат в сертификате, и соответствует ли этот процесс СОПу, если он есть.

9.0 Квалификация приборов

- 9.1 Имеется ли СОП на квалификацию ВЭЖХ (ГХ) оборудования? Каков интервал между квалификациями? Каковы критерии приемлемости? Документируются ли квалификации в журнале оборудования? Кто проводит квалификацию (фирма-поставщик, работники предприятия, лаборанты)? Кто проверяет отчеты о квалификации? Будут запрошены один или несколько отчетов. Было ли проведено IQ/OQ перед началом использования?
- 9.2 Проходят ли весы периодическую квалификацию? Какова минимальная навеска взвешиваемая в лаборатории? Проводится ли верификация весов со стандартными гирьками? Если да, с какой частотой? Находятся ли веса гирек в диапазоне шкалы весов?

- Сертифицированы ли гирьки? Проходят ли они периодическую квалификацию? Будет запрошена соответствующая документация.
- 9.3 Проходит ли рН-метр периодическую квалификацию? Соответствуют ли буферы для стандартизации рН-электрода значениям рН измеряемых образцов?
- 9.4 Также будут проверены процедуры внешних и внутренних квалификаций других аналитических приборов: температуры плавления, поляриметра, приборов по растворению и распадению таблеток, различных спектрометров, ООУ и т.д.

10.0 Заключительная часть

В заключение будет детально проверен один или несколько анализов. Будет проверен тренинг и квалификация лаборантов, выполнявших анализ, статус всех приборов, реагентов, растворов, стандартов в момент анализа. Будут проверены записи в лабораторном журнале на соответствие написанному в методике/ монографии. При необходимости будут запрошены отчеты о квалификации конкретных приборов и любая другая необходимая документация.

Готовые ВЭЖХ решения *IBS Pharm*[™] и *IBS Nutri*[™]

www.hplc.today/rus, sales@hplc.today

Готовые ВЭЖХ решения *IBS Pharm* и *IBS Nutri* поставляются с ВЭЖХ колонкой и одним или несколькими специализированными ВЭЖХ приложениями. Специализированные приложения предназначены для решения типовых отраслевых аналитических задач, которые возникают: в фармацевтике, биотехнологиях, сельском хозяйстве, пищевой, химической, нефтяной и энергетической промышленности.

Отличительные черты готовых ВЭЖХ решений *IBS Pharm* и *IBS Nutri*

1. Для всех решений *IBS Pharm* и *IBS Nutri* применен исключительно режим изократического элюирования, который обеспечивает высокую робастность (надежность) ВЭЖХ разделений и возможность использования различных специфичных режимов ВЭЖХ в дополнение к «стандартному» неспецифическому обращено-фазовому режиму.
2. Превосходная специфичность разделения значительно снижает вероятность негативного влияния матрицы образца на ВЭЖХ разделение, что позволяет применять неспецифичные, но широко распространенные УФ и рефрактометрические детекторы даже в случае сложных образцов.
3. Широкое применение ионного (IC), гидрофильного (HILIC), переносно-зарядного (CT), ион-эксклюзионного (IEC) и смешанных режимов обеспечивает превосходную специфичность разделения,

а в некоторых случаях дает возможность существенно сократить процедуру пробоподготовки образца.

4. Упор на применение длинных и эффективных колонок, заполненных полностью пористыми частицами, обеспечивает высокую нагрузочную способность в каждом из решений и, следовательно, возможность анализировать образцы, которые содержат целевые соединения в различных концентрациях, в условиях перегрузки колонки.
5. Готовые ВЭЖХ решения *IBS Pharm* и *IBS Nutri* могут быть опционально настроены специалистами компании на анализ конкретных объектов заказчика.

Список готовых ВЭЖХ решений *IBS Pharm*

АН: Антигипертензивные препараты.

МА: Комбинации основных фармацевтиков.

СМ: Фармацевтические комбинации, содержащие парацетамол, кофеин и фенobarбитал.

IN: Нестероидные противовоспалительные препараты.

НС: Антигистаминные и родственные фармацевтики.

Список готовых ВЭЖХ решений *IBS Nutri*

PS: Подсластители, консерванты и азокрасители в напитках.

BS: Консерванты в жиросодержащих пищевых продуктах.

A: Органические фруктовые кислоты.

AA: Добавленные аминокислоты в премиксах.

NA: Натуральные формы витаминов В1 и В3 в продуктах питания.

ВА: Водорастворимые витамины в пищевых добавках и премиксах.

AF: Витамины С и В9 в пищевых добавках и премиксах.

Н: Витамины Н и В5 в пищевых добавках и премиксах.

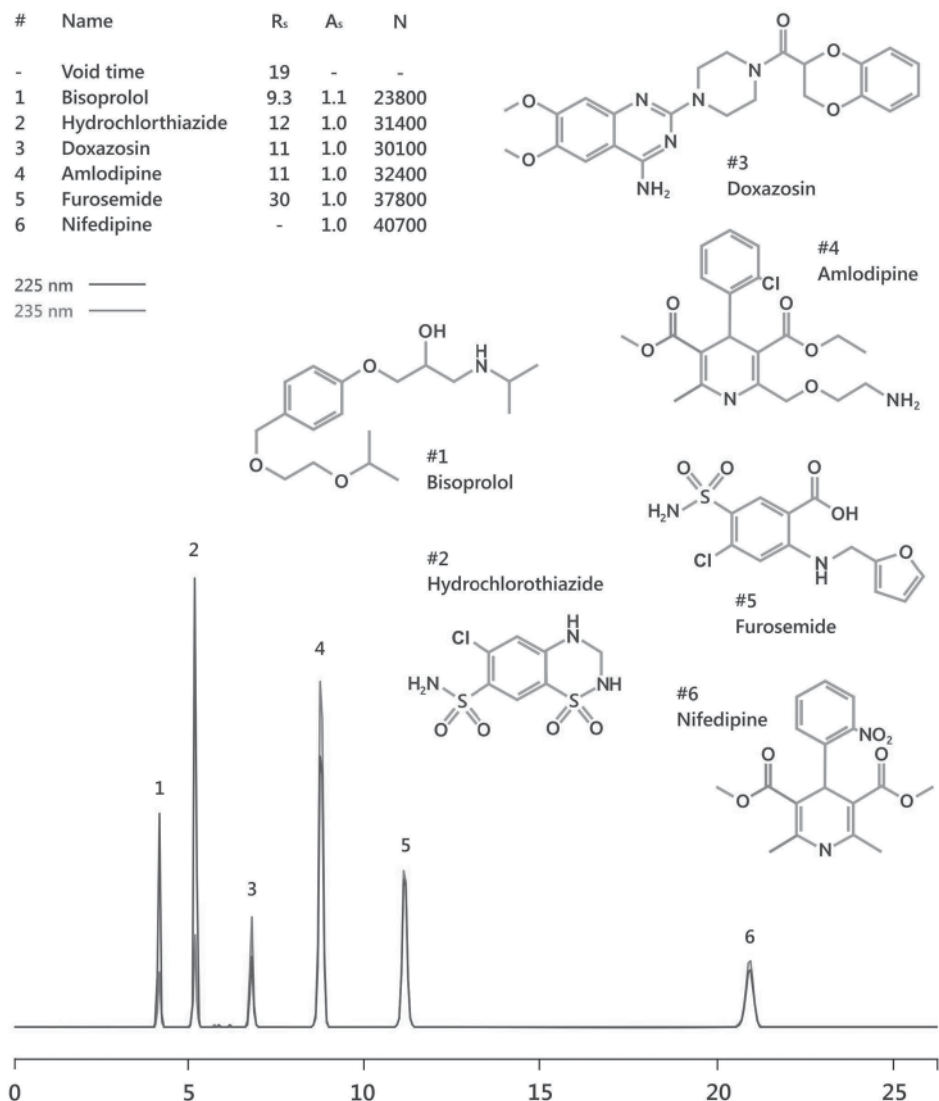
ВЕТ: Бетаины и витамин В1 в пищевых добавках и премиксах.

Примеры специализированных ВЭЖХ приложений IBS Pharm и IBS Nutri

Изократическое разделение смеси антигипертензивных соединений
различных классов и диуретиков на неподвижной фазе IBS Pharm AH

#	Name	R _s	A _s	N
-	Void time	19	-	-
1	Bisoprolol	9.3	1.1	23800
2	Hydrochlorothiazide	12	1.0	31400
3	Doxazosin	11	1.0	30100
4	Amlodipine	11	1.0	32400
5	Furosemide	30	1.0	37800
6	Nifedipine	-	1.0	40700

225 nm —
235 nm —



Неподвижная фаза: 250x4.6 IBS Pharm AH

Подвижная фаза: Ацетонитрил-(50 мМ NH₄H₂PO₄ + 0.1% H₃PO₄) 35:65

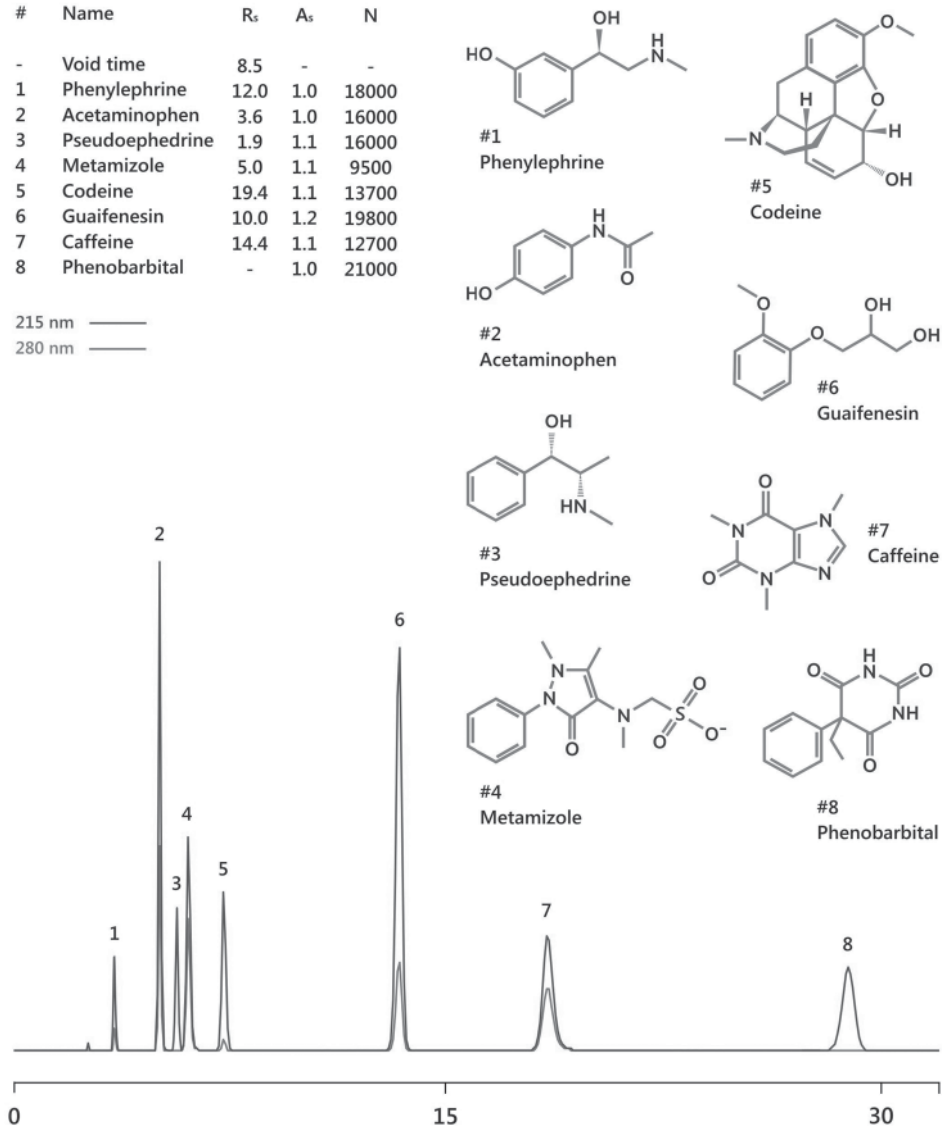
Скорость потока: 1.0 мл/мин

Температура колонки: 25 °С

Изократическое разделение смеси соединений, в различных комбинациях составляющих противоположные препараты, на неподвижной фазе IBS Pharm CM

#	Name	R _s	A _s	N
-	Void time	8.5	-	-
1	Phenylephrine	12.0	1.0	18000
2	Acetaminophen	3.6	1.0	16000
3	Pseudoephedrine	1.9	1.1	16000
4	Metamizole	5.0	1.1	9500
5	Codeine	19.4	1.1	13700
6	Guaifenesin	10.0	1.2	19800
7	Caffeine	14.4	1.1	12700
8	Phenobarbital	-	1.0	21000

215 nm —
280 nm —



Неподвижная фаза: 250x4.6 IBS Pharm CM

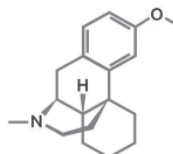
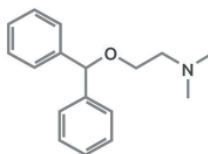
Подвижная фаза: Ацетонитрил-(50 мМ NH₄H₂PO₄) 20:80

Скорость потока: 1.0 мл/мин

Температура колонки: 25 °С

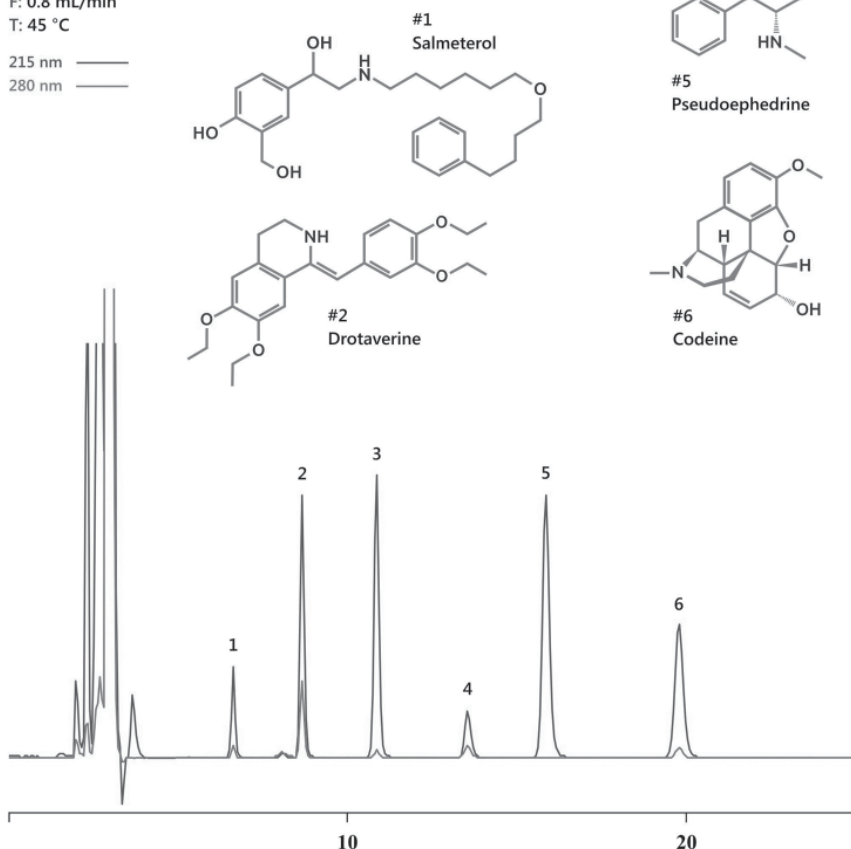
Изократическое разделение смеси одноосновных азотистых
фармацевтиков на неподвижной фазе IBS Pharm MA

#	Name	R _s	A _s	N
1	Salmeterol	10.2	1.0	21400
2	Drotaverine	9.3	1.1	24700
3	Diphenhydramine	9.2	1.1	28700
4	Dextromethorphan	6.6	1.2	26600
5	Pseudoephedrine	9.5	1.15	29400
6	Codeine	-	1.1	30000

#3
Diphenhydramine#4
Dextromethorphan

SP: IBS Pharm MA, 250x4.6 3um
MP: Acetonitrile-Methanol-Buffer 35:15:50,
Buffer = 50mM NH₄H₂PO₄ + 0.2% H₃PO₄
F: 0.8 mL/min
T: 45 °C

215 nm ———
280 nm ———



Неподвижная фаза: 250x4.6 IBS Pharm MA

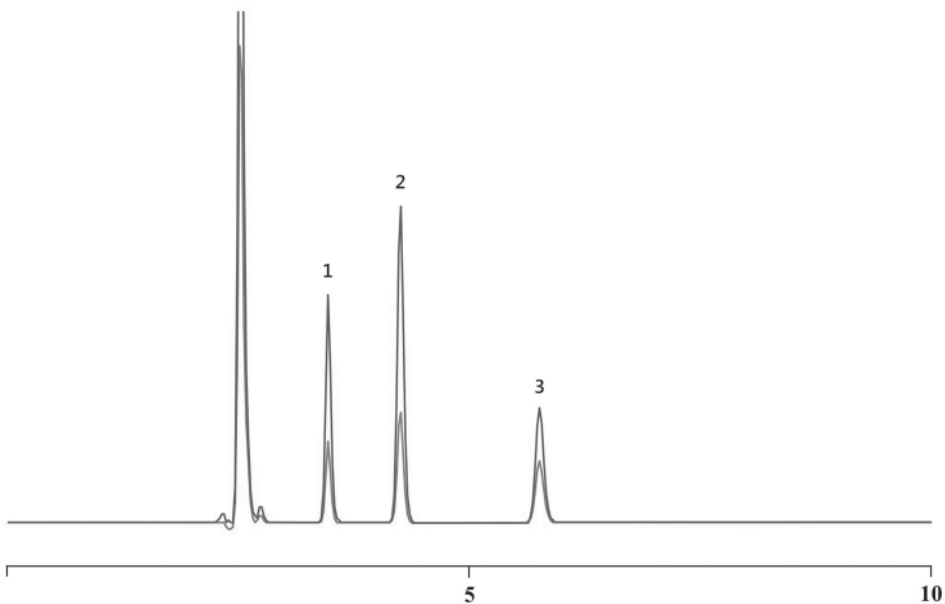
Подвижная фаза: Ацетонитрил-Метанол-(50 мМ NH₄H₂PO₄ + 0.2 % H₃PO₄) 35:15:50

Скорость потока: 0.8 мл/мин

Температура колонки: 45 °C

Высокоселективное изократическое разделение бетаина, карнитина и тиамина (витамин В1) на фоне комплексного витаминного препарата на неподвижной фазе IBS Nutri BET

#	Name	R _s	A _s	N	SP: IBS Nutri BET, 250x4.6 3µm MP: Acetonitrile-Buffer 50:50, Buffer = 50mM NH ₄ H ₂ PO ₄ F: 1.5 mL/min T: 35 °C
1	Betaine	6.9	1.15	17600	200 nm
2	Carnitine	10.5	1.15	18800	210 nm
3	Thiamine	-	1.15	19100	



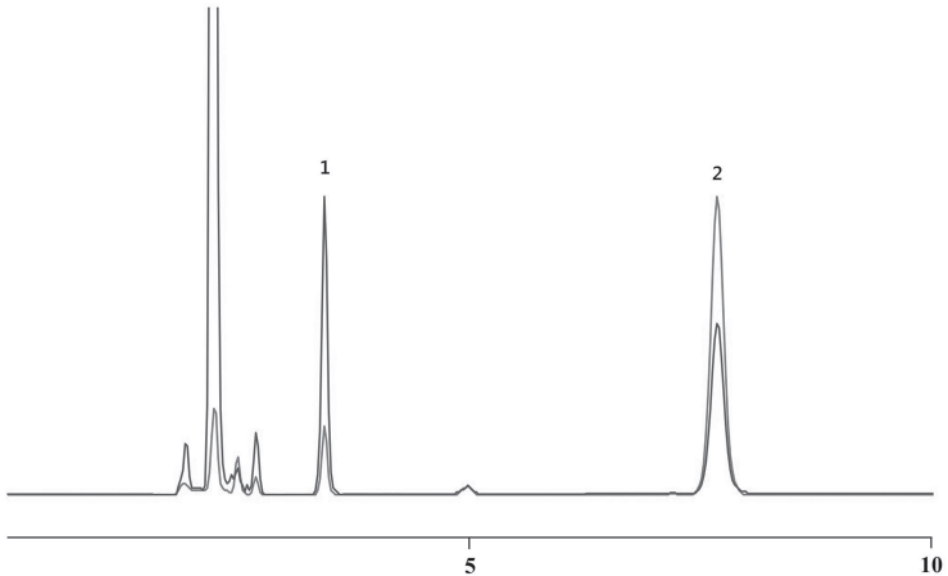
Неподвижная фаза: 250x4.6 IBS Nutri BET
 Подвижная фаза: Ацетонитрил-(50 мМ NH₄H₂PO₄) 50:50
 Скорость потока: 1.5 мл/мин
 Температура колонки: 25 °C

Высокоселективное изократическое разделение витаминов С и В9 на фоне комплексного витаминного препарата на неподвижной фазе IBS Nutri AF

#	Name	R _s	A _s	N
1	Ascorbate (C)	23	1.0	15700
2	Folate (B9)	-	1.0	13700

SP: IBS Nutri AF, 250x4.6 3um
MP: Acetonitrile-Buffer 50:50,
Buffer = 50mM NH₄H₂PO₄
F: 1.5 mL/min
T: 35 °C

260 nm —
290 nm —



Неподвижная фаза: 250x4.6 IBS Nutri AF

Подвижная фаза: Ацетонитрил-(50 мМ NH₄H₂PO₄) 50:50

Скорость потока: 1.5 мл/мин

Температура колонки: 25 °C

Краткий обзор оборудования Shimadzu для хроматографии: проверенные временем инструменты и новинки модельного ряда

Серия LC-20 Prominence

Хроматографические системы, сконфигурированные из блоков серии LC-20 Prominence, позволяют работать в различных режимах, начиная от традиционной аналитической хроматографии, сверхбыстрой высокоэффективной жидкостной хроматографии (UFLC) и заканчивая высокочувствительным нано-ВЭЖХ/МС анализом. Мы предлагаем также готовые решения, например, системы для определения аминокислот, препаративной хроматографии, эксклюзионной хроматографии и пр. Отличительными чертами серии LC-20 Prominence являются высокая чувствительность, производительность и надежность; хроматографы разрабатывались для длительной работы в автономном режиме (без участия оператора). Отсюда — высокая степень автоматизации, долговечность расходных компонентов, возможность управления системой от удаленного компьютера (через интернет). Насосы серии LC-20 Prominence позволяют с высокой точностью создавать стабильные потоки подвижной фазы, начиная от 0,0001 мл/мин. Использование новых материалов позволило в несколько раз увеличить срок их службы. На сегодняшний день они являются самыми надежными в мире. Спектрофотометрические детекторы серии LC-20 Prominence, SPD-20A и SPD-M20A обеспечивают самый низкий в мире уровень шума и высочайшую чувствительность, благодаря термостатированию измерительных ячеек и новой технологии обработки сигналов. Специальные материалы, использованные при изготовлении автодозатора SIL-20A, практически полностью исключают эффект памяти даже при анализе проб, активно сорбируемых поверхностью

обычных материалов. При необходимости автодозатор SIL-20A и устройство RackChanger для замены планшетов в автодозаторе могут оснащаться опцией охлаждения образцов. Термостат колонок СТО-20А обеспечивает высокую воспроизводимость поддержания температурного режима. Можно проводить анализ при программировании температуры колонок. Оснащение термостата опцией охлаждения позволяет проводить анализ при температурах ниже комнатной. В термостат можно устанавливать кран-дозатор, а также краны для переключения колонок.

УВЭЖХ-система на платформе Nexera X2

При сохранении надежности и функциональности модулей серии Prominence, УВЭЖХ система Nexera X2 обладает выдающимися характеристиками по таким показателям как скорость анализа и хроматографическое разрешение. Новый насос Шимадзу, в основе которого лежит апробированная в течение более 20 лет технология параллельного двухплунжерного механизма, создает поток подвижной фазы без пульсаций и поддерживает давление на входе в хроматографическую колонку вплоть до 130 МПа (при скорости до 3 мл/мин). Усовершенствованные конструкции плунжеров и прокладок обеспечивают такой срок эксплуатации, который до сегодняшнего дня был характерен только для ВЭЖХ систем, работающих при давлении не выше 40 МПа. Благодаря возможности использования давления на входе в колонку вплоть до 130 МПа при относительно высокой скорости потока подвижной фазы можно не только существенно сократить время анализа, тем самым увеличив производительность системы, но и добиться высочайшего уровня разрешения пиков за счет использования более длинных хроматографических колонок с малым размером частиц неподвижной фазы (< 2 мкм). В системе Nexera X2 установлен новый градиентный смеситель на основе микрореакторспециальной конструкции с объемом смешивания всего 20 мкл. Использование микрореактора является одним из существенных преимуществ системы Nexera X2, поскольку позволяет минимизировать мертвый объем хроматографической системы и, соответственно, осуществлять быстрое градиентное элюирование. Еще одним компонентом, обеспечивающим высочайшую производительность системы, является автодозатор SIL-30АС. Его характеристики — уровень перекрестного загрязнения, время инъекции и воспроизводимость дозирования пробы — делают

его уникальным прибором среди другой техники для ВЭЖХ. Новая конструкция клапанов, предназначенных для работы в области сверхвысоких давлений, обеспечивает абсолютную надежность автодозатора и длительный срок бесперебойной эксплуатации, характерный для традиционной ВЭЖХ. Конструкция иглы и порта для ввода пробы позволяет минимизировать зону контакта между ними для уменьшения перекрестного загрязнения. С этой же целью в автодозатор добавлены две дополнительные линии для промывки внешней поверхности иглы и ее внутреннего объема. Все три линии могут управляться независимо друг от друга при помощи отдельного насоса. Новый термостат СТО-30А позволяет проводить хроматографическое разделение при температурах до 150 °С. Специальное контрольное устройство — «тепловые весы» — предназначено для выравнивания температурного градиента, возникающего в хроматографической колонке при работе со сверхвысокими давлениями. Термостат может использоваться в качестве постколоночного реактора, что существенно расширяет область применения системы. В качестве опции в комплектацию термостата может быть добавлен специальный охладитель для выходящего из колонки элюента. Система УВЭЖХ Nexera X2 может быть укомплектована спектрофлуориметрическим RF-20A/AXS и диодно-матричным SPD-M30A детекторами, спектрофотометрическими, диодноматричным и рефрактометрическим детекторами серии Prominence, кондуктометрическим детектором 10-й серии, а также сверхбыстрыми жидкостными масс-спектрометрическими детекторами. Все детекторы обеспечивают высочайшее соотношение «сигнал/шум» и, соответственно, высочайшую чувствительность анализа.

Система Nexera X2 может быть использована для обычной, полумикро- и сверхбыстрой жидкостной хроматографии без замены модулей и какого-либо изменения линий подачи подвижной фазы. Таким образом, Nexera X2 является на сегодняшний день единственной на рынке универсальной высокопроизводительной хроматографической системой, которая может с успехом применяться в фармацевтической и пищевой промышленности, для биологических и биотехнологических исследований, для анализа объектов окружающей среды, словом везде, где пользователю нужны высочайшая производительность, непревзойденная чувствительность анализа, достоверность получаемых результатов и надежность оборудования.

Жидкостные хроматографы Nexera-I и Prominence-i

Моноблочные жидкостные хроматографы «i-серии» — надежные, компактные, высокопроизводительные и удобные в эксплуатации. Хроматографы могут использоваться как для ежедневных рутинных анализов, так и для проведения серий анализов в автоматическом режиме, освобождая оператора от необходимости личного присутствия. Все модели хроматографов оснащены встроенным детектором, дегазатором, автодозатором с низкой величиной перекрестного загрязнения (в пределах 0,0025 %), термостатом колонок и системой автоматической валидации. При помощи опционального аналого-цифрового преобразователя хроматографы могут дополнительно оснащаться вторым детектором: спектрофлуориметрическим, дифференциальным рефрактометрическим или детектором по светорассеиванию. В дополнение к термостатируемым проточным ячейкам детектора, в моделях i-серии используется новая технология контроля температуры оптических систем детектора (технология TCOptics), которая обеспечивает отличную воспроизводимость результатов и высокую чувствительность анализа, что дает возможность определения следовых количеств аналитов даже при значительных колебаниях окружающей температуры. Воплощение современных технологий в аналитической лаборатории.

Приборы соответствуют требованиям как больших, так и малых лабораторий. Основная концепция i-серии: инновации, интеллектуальные возможности, повышающие эффективность работы лаборатории, и интуитивно понятное управление. Приборы Prominence-i и Nexera-i идеально подходят для выполнения ежедневных рутинных анализов в лабораториях химической, фармацевтической, пищевой промышленности, а также в лабораториях экологического мониторинга. Системы могут управляться как программным обеспечением, так и мультизадачным клиент-сервером. Компактные размеры приборов позволяют эргономично использовать пространство любой лаборатории.

В сравнении с предыдущей моделью LC-2010, улучшены все компоненты системы: насос, дегазатор, автодозатор и термостат колонок. Исследуемые образцы можно охлаждать, для детектирования сигналов используются УФ-Вид или диодно-матричный детектор. Термостат колонок позволяет проводить анализы при температуре до 85 °С и вмещает 3 хроматографические колонки длиной до 30 см или 6 колонок длиной

до 10 см. Автодозатор обеспечивает высокую воспроизводимость результатов при минимальном (менее 1 мкл) объеме ввода образца и отличается низким уровнем (в пределах 0,0025 %) перекрестного загрязнения, что особенно важно при анализе образцов со сложной матрицей. Более того, серия Prominence-i способна работать в диапазоне давлений до 440 бар, а серия Nexera-i – при давлениях до 660 бар.

Интерактивный режим управления ICM (Interactive Communication Mode) позволяет оператору задавать и редактировать аналитические условия измерения непосредственно на сенсорном дисплее прибора или через управляющий компьютер. Вновь созданные или измененные файлы аналитического метода автоматически синхронизируются с программным обеспечением LabSolutions. Даже при значительных колебаниях температуры окружающей среды в приборах i-серии отсутствует дрейф или флуктуация базовой линии благодаря термостатируемой проточной ячейке и термостатируемой оптической системе (TC-optics). Продолжительность цикла по вводу образца сокращена до 14 с, что позволяет проводить потоковый анализ с высокой производительностью и минимальным перекрестным загрязнением. Кроме того, в автодозатор можно установить до 336 виал объемом 1 мл или до четырех 384-луночных микротитрационных планшетов (всего 1536 образцов). В стандартной конфигурации хроматографов предусмотрен выбор между двумя вариантами детектора: спектрофотометрическим УФ-Вид или диодно-матричным. В случае необходимости приборы можно дооснастить спектрофлуориметрическим, дифференциальным рефрактометрическим или детектором по светорассеянию. Кроме того, при установке аналоговой платы возможен сбор данных с других детекторов. При комбинировании инновационного рефрактометрического детектора RID-20A с моделью хроматографа i-серии, оснащенного диодно-матричным детектором, возможно определение молекулярной массы полимеров. Интерактивное управление прибором позволяет осуществлять дистанционный контроль работы системы, просмотр и обработку полученных результатов. При помощи цветной сенсорной панели прибора пользователь может контролировать текущее состояние хроматографа, анализировать хроматограммы, а также создавать или изменять файл метода.

Интеллектуальные возможности приборов i-серии позволяют легко адаптировать уже имеющиеся методики хроматографического анализа для работы с оборудованием. Кроме того, все приборы могут работать в полностью автоматическом режиме. Функция

автовалидации «AutoValidation» в хроматографах i-серии формирует отчет автоматической проверки системы, в котором содержится информация о стабильности подачи растворителя, точности установки длины волны, точности определения коэффициента абсорбции, наличии шума/дрейфа и другие параметры. Функция «System Check» позволяет осуществлять регулярную проверку прибора перед началом работы, создавать отчеты о результатах самодиагностики и об используемых расходных материалах (общий объем поставленного растворителя, количество инъекций, количество часов работы лампы и т.п.) Результаты полученных отчетов можно просмотреть на компьютере или распечатать на принтере. Функция автопроверки позволяет с точностью определить и подтвердить рабочий статус прибора.

Унифицированный графический интерфейс и обновленная программа LabSolutions повышают удобство эксплуатации прибора. В управляющем программном обеспечении добавлена функция «Quick Watch», с помощью которой пользователь может легко создавать последовательность анализа образцов путем выбора позиции виалы в автодозаторе.

Комбинация приборов i-серии с программным обеспечением LabSolution и универсальным пользовательским интерфейсом делает управление хроматографом предельно простым даже для оператора с начальным уровнем подготовки. Широкая приборная линейка жидкостных хроматографов Shimadzu отвечает всем современным требованиям, предъявляемым к аналитическому оборудованию, предназначенному для решения задач традиционной и ультрабыстрой жидкостной хроматографии.

Система для комплексной хроматографии Shimadzu Nexera UC SFE–SFC–MS

Хроматографическая система Nexera UC SFE–SFC–MS кардинальным образом увеличивает эффективность работы современной аналитической лаборатории, реализуя принципиально новую технологию, так называемую «комплексную хроматографию» (UC, Unified Chromatography). Nexera UC — первое в мире универсальное решение, включающее встроенную систему пробоподготовки онлайн-методом сверхкритической флюидной экстракции, разделение компонентов образца в режиме сверхкритической флюидной хроматографии и высокочувствительное масс-спектрометрическое детектирование.

В методах сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ) и сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) в качестве экстрагента и подвижной фазы используют так называемый «сверхкритический» диоксид углерода (СК-СО₂) — особое состояние диоксида углерода, которого он достигает при давлении (73,8 бар) и температуре (31,1 °С). В сверхкритическом состоянии диоксид углерода демонстрирует свойства, присущие как газам, так и жидкостям. Подобно жидкости, СК-СО₂ обладает растворяющей способностью, текучестью и сравнительно высокой плотностью, но при этом его вязкость существенно меньше, а проникающая способность выше. Такое сочетание свойств, учитывая еще невысокую стоимость, делает сверхкритический диоксид углерода весьма привлекательным в качестве растворителя и подвижной фазы для экстракции и хроматографии соответственно. Применение СК-СО₂ позволяет проводить извлечение целевых компонентов из исследуемых образцов эффективнее и быстрее, сокращает время хроматографического разделения и позволяет отказаться от таких классических и довольно токсичных растворителей, как гексан, хлороформ или ацетонитрил. Nexera UC объединяет в едином процессе извлечение из твердых образцов (сухие пятна крови, полимеры, продукты питания, фармацевтические субстанции и т.п.) целевых компонентов, их хроматографическое разделение и высокочувствительное масс-спектрометрическое детектирование (МС/МС).

Полная автоматизация процесса существенно снижает риск ошибки оператора и значительно сокращает общее время анализа. Nexera UC позволяет идентифицировать и количественно определять сотни соединений различной природы в ходе одного анализа. Например, в случае определения остаточного содержания пестицидов в объектах окружающей среды и/или пищевых продуктах одна система Nexera UC может с успехом заменить традиционные методы анализа с помощью ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС. Сам процесс сверхкритической флюидной экстракции осуществляется в специализированном модуле SFE-30 (рис. 1), который позволяет проводить СФЭ в широком диапазоне условий в зависимости от природы образца и задач исследования. Например, варьировать растворяющую способность СО₂ путем изменения давления и температуры.

Благодаря тому, что извлечение целевых компонентов происходит в анаэробных условиях при относительно низкой температуре и в отсутствии света, даже самые лабильные соединения могут быть экстрагированы без изменения их нативных свойств. Диоксид

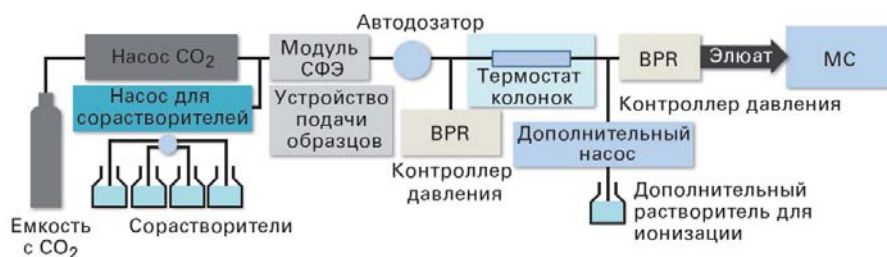


Рисунок 1: Конфигурация системы Nexera UC SFE-SFC-MS

углерода в сверхкритическом состоянии является скорее неполярным растворителем, и его растворяющей способности недостаточно для полярных соединений. Поэтому в большинстве случаев, когда CO_2 используют в качестве основы подвижной фазы для хроматографии, дополнительно вводят полярные соразтворители или модификаторы. Такая модифицированная подвижная фаза уже не находится, строго говоря, в сверхкритическом состоянии, хотя термин «сверхкритическая флюидная хроматография» продолжает использоваться. В околокритическом состоянии подвижная фаза сохраняет такие свойства, как низкая вязкость, высокая проникающая способность, но при этом характеризуется существенно меньшей зависимостью вязкости и плотности от давления и температуры. Таким образом, околокритическое состояние подвижной фазы наиболее предпочтительно и обеспечивает более надежную работу хроматографической системы (рис. 2).

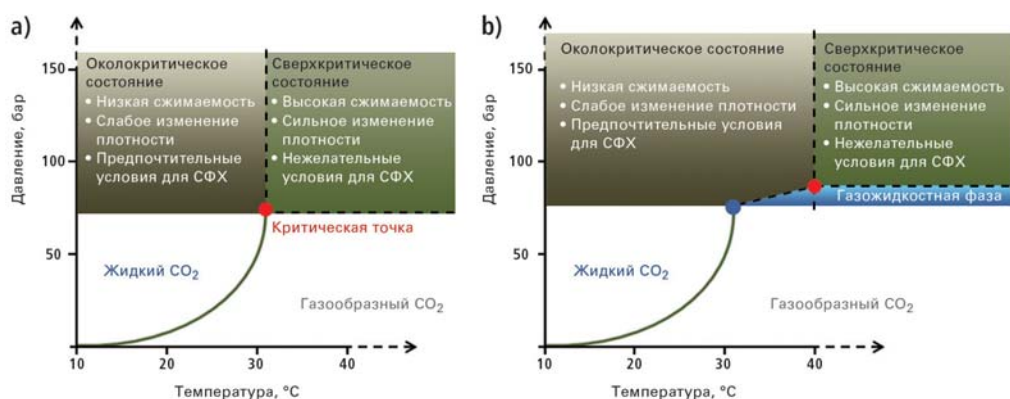


Рисунок 2: Фазовая диаграмма для

а) CO_2 (критическая точка при давлении 73,8 бар и температуре 31,1 °C)
и б) смеси CO_2 (96,5 %) и метанола (3,5 %) (критическая точка при давлении 83 бар и температуре 40 °C [Eric Lesellier ICOA, UMR 7311, SFC 2014])

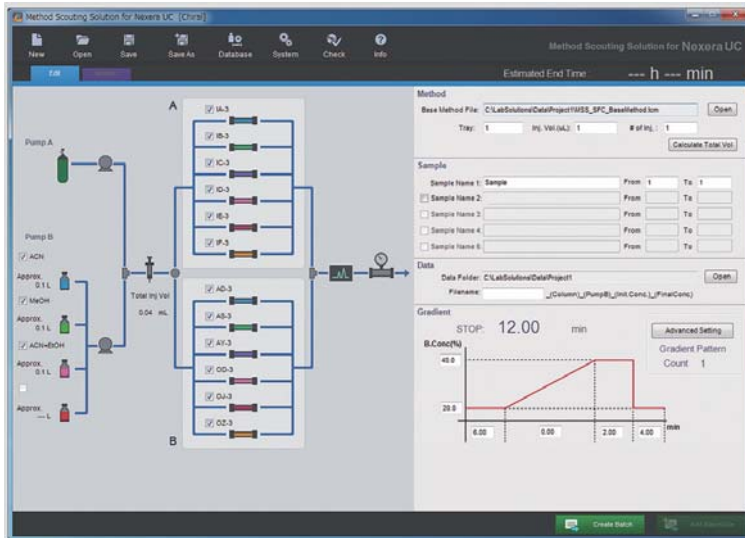


Рисунок 3: Программа «Method Scouting Solution»,
окно программирования условий анализа

В качестве соразтворителей используют низшие спирты (как доноры водородных связей), ацетонитрил (как акцептор водородных связей) и ряд других соединений. Варьируя концентрацию соразтворителей в подвижной фазе, исследователь легко может управлять ее элюирующей силой и, соответственно, временем и селективностью анализа.

Nexera UC помогает быстро разрабатывать новые методики анализа или оптимизировать условия уже существующих. Для этого используют аппаратно-программную опцию “Method Scouting”, которая дает возможность произвольно комбинировать четыре соразтворителя с 12-ю различными хроматографическими колонками. Специализированное программное обеспечение позволяет быстро запрограммировать систему для поиска оптимальных условий анализа. Достаточно в соответствующем окне программы “Method Scouting Solution” отметить интересующие соразтворители и колонки, задать скорость потока подвижной фазы/время анализа (рис. 3), и программа автоматически сформирует файлы с условиями измерения и запустит последовательность анализов. Расширенные возможности анализа полученных результатов дают исследователю информацию, чтобы в дальнейшем выбрать оптимальные условия разделения.

По сравнению с традиционной жидкостной хромато-масс-спектрометрией СФХ-МС-анализ позволяет определять существенно более низкие концентрации целевых соединений. Это достигается, во-

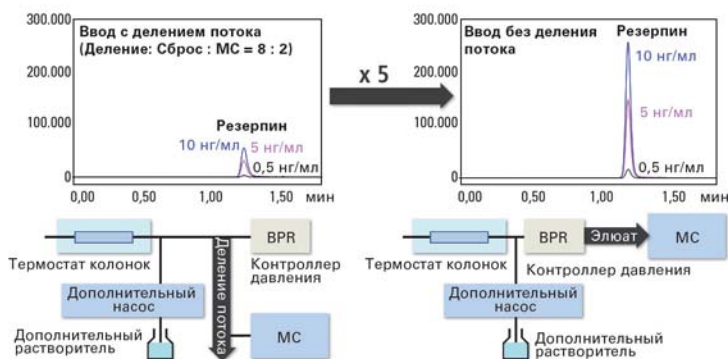


Рисунок 4: Увеличение чувствительности анализа благодаря использованию контроллера давления с минимальным мёртвым объёмом

первых, благодаря дополнительному концентрированию аналита за счет испарения CO_2 , а во-вторых, вследствие использования контроллера давления с минимальным мертвым объемом. Минимальный мертвый объем позволяет отказаться от деления потока перед вводом в детектор, и, соответственно, весь объем элюата поступает в масс-спектрометр. Это увеличивает общую чувствительность Nexera UC приблизительно в пять раз по сравнению с системами, в которых используются контроллеры давления традиционной конструкции (рис. 4).

Новая УВЭЖХ серия Nexera LC-40

В 2019 корпорация Шимадзу представила новую модульную линейку для ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ) Nexera LC-40.

Новая серия представляет собой квинтэссенцию инновационных технологий в жидкостной хроматографии в плане эффективности работы, интеллектуального управления функциями прибора и дизайна.

Отличительной особенностью Nexera LC-40 является система искусственного интеллекта (IA), позволяющая хроматографической системе самостоятельно обнаруживать и решать возникающие в ходе анализа проблемы. Традиционные способы управления прибором с помощью персонального компьютера или сенсорной панели на корпусе прибора интегрировано в LC-40 с возможностью удаленного доступа с использованием Интернета Вещей (IoT), что существенно упрощает контроль состояния приборов и оптимизирует распределение ресурсов лаборатории.

Простота использования обеспечивает работу без ошибок

Благодаря сочетанию IoT и AI Nexera LC-40 позволяет избежать наиболее распространенных ошибок при работе с ВЭЖХ, что гарантирует высокую эффективность работы и получение наилучших возможных результатов. Интеллектуальные функции программного обеспечения позволяют осуществлять тщательный мониторинг состояния для правильной настройки интервалов технического обслуживания. Это гарантирует минимальное время простоя системы и максимальную экономию времени.

Максимальные надежность и время безотказной работы

УВЭЖХ система Nexera LC-40 предоставляет расширенные возможности диагностики, а также функции автоматического восстановления, помогающие пользователям в их повседневной работе.

Функция умного пуска защищает колонки

Чтобы предотвратить повреждение колонок ВЭЖХ при пусках и остановках насоса или экстремальных изменениях градиента, в серии

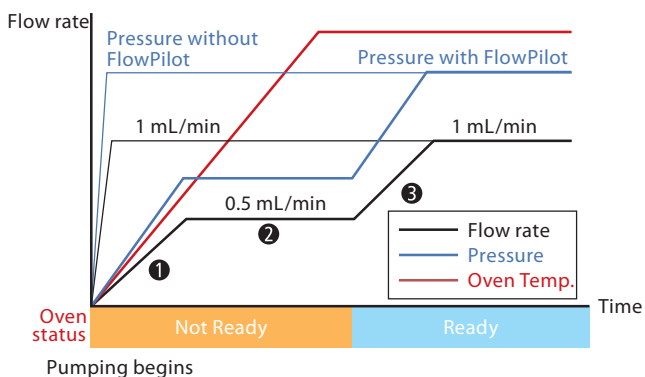


Рисунок 5. Предотвращение скачков давления подвижной фазы при помощи функции Smart Flow Pilot

Flow rate >> поток

Time >> время

Oven status >> Состояние термостата колонок

Pumping begins >> Включение насоса

mL/min >> мл/мин

Pressure >> Давление

Oven Temp. >> Темп. термостата

Pressure without Flow Pilot >> Давление без использования функции Flow Pilot

Pressure with Flow Pilot >> Давление при использовании функции Flow Pilot

Not Ready >> Состояние неготовности

Ready >> Состояние готовности

Nexera LC-40 реализована функция Smart Flow Pilot (рис. 5), которая постепенно увеличивает поток подвижной фазы до заданного значения. Нет необходимости создавать протоколы запуска для каждого анализа.

1. Постепенное увеличение скорости потока подвижной фазы до половины установленного значения.

2. Поддержание постоянной скорости потока до момента установления заданной температуры в термостате колонок.

3. Постепенное увеличение скорости потока подвижной фазы до установленного значения.

Количество подвижной фазы контролируется в режиме реального времени

Поддон для растворителей, вмещающий до 12 резервуаров, оснащен датчиками веса, которые используются для контроля количества подвижной фазы и растворов для промывки автодозатора. Теперь не нужно заранее рассчитывать, хватит ли подвижной фазы для проведения анализа, поскольку система гарантирует, что количества подвижной фазы будет достаточно для завершения анализа, в противном же случае пользователь получит предупреждение. Разумеется, что мониторинг количества подвижной фазы можно проводить удаленно с использованием соответствующего мобильного устройства.

Автоматическое восстановление при попадании пузырьков воздуха в линию подачи подвижной фазы

Образующиеся в подвижной фазе пузырьки воздуха при попадании в насос могут вызвать проблемы. Система Nexera LC-40 способна отслеживать колебания давления подвижной фазы и изменения базовой линии. Когда система обнаруживает необычные колебания, она может автоматически очистить линии подачи подвижной фазы и повторно ввести образец сразу же после того, как поток и давление подвижной фазы восстановятся до нормального значения (рис. 6).

Автоматизация рабочего процесса и максимальное увеличение производительности

Быстрая надежная работа в автоматическом режиме является залогом высокой эффективности аналитической лаборатории.

Автоматический анализ тысяч образцов

Приборы серии Nexera LC-40 обеспечивают возможность бесперебойного анализа тысячи образцов при помощи нового устрой-

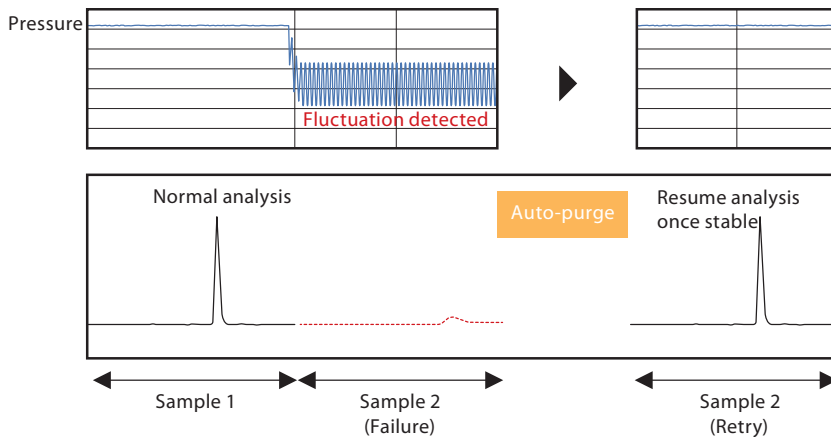


Рисунок 6. Автоматическое восстановление нормальной работы системы в случае попадания пузырьков воздуха в линию подачи подвижной фазы

Pressure >> Давление

Fluctuation detected >> Обнаружение колебаний давления

Sample 1 >> Образец 1

Sample 2 (failure) >> Образец 2 (Ошибка)

Normal analysis >> Обычный анализ

Auto-purge >> Автоматическая промывка

Sample 2 (Retry) >> Образец 2 (Повтор)

Resume analysis once stable >> Повтор анализа после восстановления

ства автоматической загрузки, вмещающего до 14 микротитрационных планшет или подставок для виал. За счет прецизионного контроля температуры автодозатора и устройства автоматической загрузки пользователь имеет возможность оперативно добавлять/заменять планшеты или подставки с виалами в ходе анализа.

Система двойного ввода позволяет проводить одновременный анализ двух образцов

В системе могут быть сконфигурированы две независимые аналитические линии с возможностью одновременного анализа двух различных образцов (рис. 7). Таким образом удваивается производительность работы системы.

Эффективное управление ресурсами лаборатории

Функция Lab Total Smart Service Net позволяет эффективно управлять работой лаборатории. Она анализирует и сравнивает работу аналитических приборов для того, чтобы обеспечить их максимально

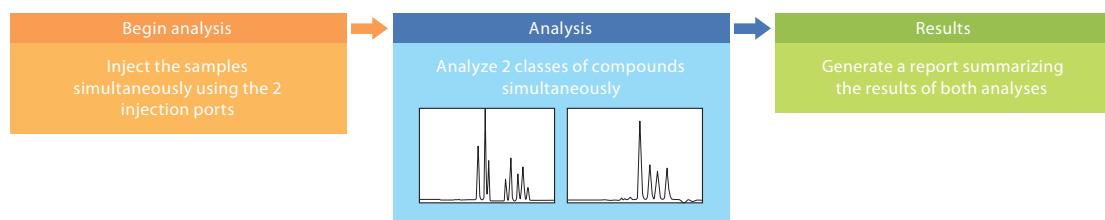


Рисунок 7. Одновременное использование двух независимых аналитических линий
Begin analysis >> Начало анализа

Inject the samples simultaneously using the 2 injection ports >> Одновременный ввод образцов в 2 инъекционных порта

Analysis >> Анализ

Analyze 2 classes of compounds simultaneously >> Одновременный анализ 2 различных образцов

Results >> Результаты

Generating a report summarizing the results of both analyses >> Создание суммарного отчета с результатами анализа 2 образцов

эффективное использование, а также централизованное управление расходными материалами и запасными частями.

Компактный размер и функциональный дизайн

Конструкция Nexera LC-40 объединяет удобные для пользователя функции с превосходными техническими характеристиками, при этом модули новой серии занимают существенно меньше места.

Компактный размер

Размер новых модулей системы уменьшен на две трети по сравнению с предыдущими сериями жидкостных хроматографов Шимадзу (рис. 8). Компактный размер без ущерба техническим и эксплуатационным характеристикам позволяет более эффективно использовать рабочее пространство лаборатории.

Рисунок 8. Сравнение размеров модулей Nexera LC-40 и модулей предыдущих серий жидкостных хроматографов Шимадзу



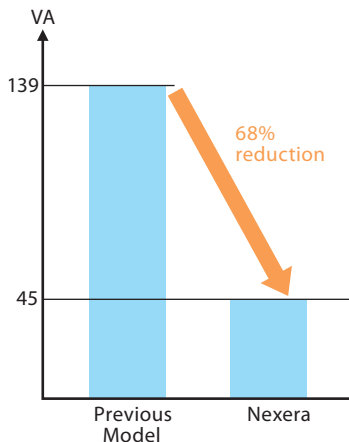


Рисунок 9. Уменьшение потребления электроэнергии в режиме ожидания
Previous Model >>Предыдущая модель
68% reduction >>Снижение на 68%
Power consumption on standby>>Потребление энергии в режиме ожидания

Энергосберегающий режим ожидания

Nexera LC-40 потребляет в режиме ожидания на 68 % меньше электроэнергии по сравнению с традиционными моделями жидкостных хроматографов (рис. 9), тем самым существенно снижая эксплуатационные расходы лаборатории и внося свой вклад в дело охраны окружающей среды.

Высокопроизводительный тандемный квадрупольный жидкостный хроматомасс-спектрометр LCMS-8060

Корпорация Shimadzu была первой, кто реализовал высокоскоростные технологии в масс-спектрометрии, чтобы полностью удовлетворить потребности пользователей в быстродействующих и чувствительных масс-спектрометрических детекторах для систем сверхбыстрой хроматографии сверхвысокого разрешения (УВЖХ).

Модели линейки UFMS (Ultra Fast Mass Spectrometry, Сверхбыстрая масс-спектрометрия) фактически установили новый стандарт быстродействия тандемных масс-спектрометров. Модель LCMS-8060 также характеризуется высочайшим уровнем производительности и быстродействия и призвана изменить существующие представления о пределах чувствительности современных аналитических приборов.



Рис. 10. История создания тандемных жидкостных хроматомасс-спектрометров Шимадзу

Масс-спектрометр LCMS-8060 оснащается инновационной системой электрораспылительной ионизации с нагреваемым газом «Heated-ESI», имеет возможность сверхбыстрого (5 мс) переключения полярности ионизации, а также быстродействующие квадрупольные анализаторы масс и ячейку соударительной диссоциации третьего поколения UFsweeper III. На сегодняшний день он является самым быстродействующим тандемным жидкостным масс-спектрометрами: скорость сканирования полного диапазона масс достигает величины 30'000 а.е.м./с, а минимальное время регистрации MRM-перехода составляет всего 0,8 мс.

Высочайшее быстродействие в сочетании с уникальной чувствительностью

При разработке масс-спектрометра основное внимание было уделено максимальному повышению чувствительности анализа. Система ионизации «Heated-ESI» существенно увеличивает эффективность ионизации и десольватации, поэтому для ещё большего увеличения чувствительности необходимо добиться минимального уровня потерь ионов на пути от источника ионизации до анализатора масс. На величину соотношения «сигнал/шум» и, соответственно,

на чувствительность анализа также оказывает существенное влияние загрязнение камеры ионизации и элементов ионной оптики. Поэтому те элементы конструкции, которые ответственны за транспорт ионов, были значительно усовершенствованы. Новая система ионной оптики UF Qarray (рис. 11), улучшенная конструкция линии десольватации и мощная система вакуумирования обеспечивают сфокусированный поток ионов с

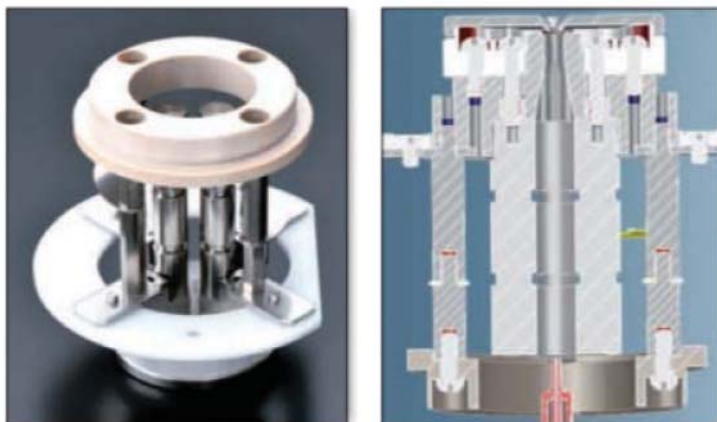


Рисунок 11. Система ионной оптики UF Qarray, обеспечивающая высочайшую чувствительность LCMS-8060

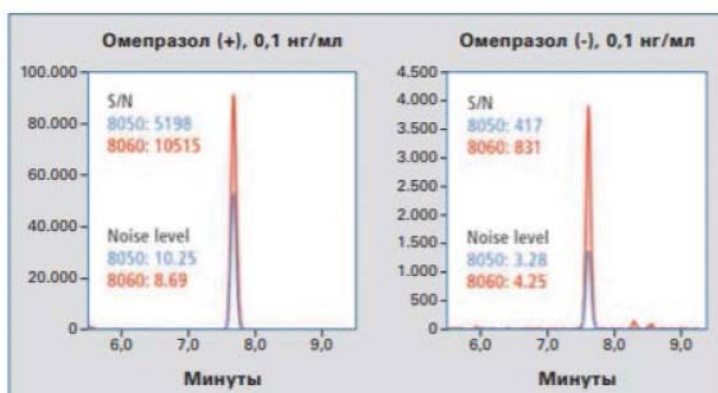


Рисунок 12. Сравнение величины соотношения «сигнал/шум» (S/N) при определении омепразола

минимальными потерями. Конструкции UF Qarray и линии десольватации к тому же существенно меньше подвержены загрязнению. Все это в комплексе приводит к усилению интенсивности сигналов целевых компонентов (рис. 12) при том, что интенсивность шума не возрастает и остаётся на уровне, характерном для предыдущих моделей масс-спектрометров. Таким образом соотношение «сигнал/шум» достигает впечатляющих величин, что делает модель LCMS-8060 самым чувствительным tandemным жидкостным масс-спектрометром на рынке.

Такой уровень чувствительности позволяет количественно определять следовые количества целевых соединений. Это особенно

важно при анализе образцов со сложной матрицей, например, биологических жидкостей или экстрактов из пищевых продуктов. Для снижения интерферирующего влияния матрицы такие образцы как правило разводят, и при этом, естественно, снижается концентрация определяемых целевых компонентов. В качестве примера можно привести пример количественного определения дейтерированного норадреналина (используется в качестве внутреннего стандарта при количественном определении катехоламинов и их метаболитов в плазме крови). Как видно из рисунка 13, d6-норадреналин количественно определяется в плазме в концентрации 5 ppt. Таким образом новая модель в линейке масс-спектрометров UFMS может быть успешно использована для решения задач в области лабораторной медицины и прийти на смену традиционным методам анализа.

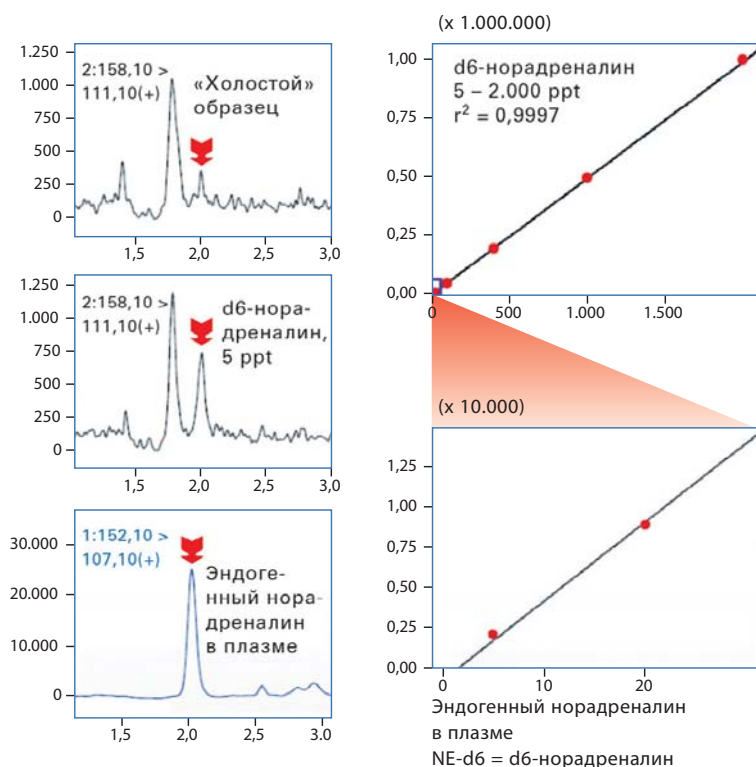


Рисунок 13: Определение d6-норадреналина в плазме (5 ppt).
Калибровочная кривая в диапазоне 5 - 2.000 ppt

Унифицированное программное обеспечение

Тандемная масс-спектрометрия находит все большее применение как точный, высокочувствительный и надёжный метод количественного и качественного анализа в самых различных областях: от охраны окружающей среды до клинических исследований. Соответственно, перед производителями аналитического оборудования встаёт задача сделать работу с приборами, включая и обработку полученных результатов, максимально простой и удобной. Специалисты Shimadzu уделяют особое внимание постоянному совершенствованию как конструкции масс-спектрометров, так и программного обеспечения.

Пользователь может заменять источник ионизации (например, систему электрораспылительной ионизации на систему химической ионизации при атмосферном давлении и наоборот) за считанные минуты. При этом не требуется отключать кабели или отсоединять подводящие трубки. Замена линии десольватации также может проведена быстро и без сброса вакуума. Оптимизированная конструкция ионной оптики UF Qarray обеспечивает лёгкость профилактического обслуживания и минимизирует время простоя прибора.

Все масс-спектрометры линейки UFMS комплектуются программным обеспечением серии LabSolutions с унифицированным пользовательским интерфейсом. Для интенсификации и облегчения обработки больших массивов количественных данных программное обеспечение включает модуль Lab Solutions Insight, который позволяет буквально в несколько кликов мышью выбрать из сотен результатов именно те, которые представляют интерес для пользователя.

Дополнительные возможности

Быстродействие масс-спектрометров UFMS позволяет приборам в ходе одного анализа работать в комбинированных режимах измерения. Так, например, режим синхронизированного сканирования, «Synchronized Survey Scan», позволяет одновременно с регистрацией MRM-переходов получать полные масс-спектры продуктов фрагментации (режим работы MRM/Production Scan). Режим сканирования продуктов фрагментации автоматически запускается по достижении заданного уровня интенсивности MRM-сигнала целевого компонента. Таким образом в ходе исследования одного образца пользователь получает как точные количественные данные (MRM), так и подтверждающие качественные результаты, позволяющие надёжно идентифицировать целевое соединение за счёт анализа масс-спектра продуктов

фрагментации последнего. Это существенно увеличивает точность и информативность анализа.

Разумеется, использование комбинированного режима измерения не сказывается на качестве получаемых результатов (воспроизводимости, чувствительности и т.п.). Это видно из рисунка 14, где приведены результаты качественного и количественного определения флунизепема в образце цельной крови. В левой части рисунка показаны хроматографические пики флунизепема, полученные в режиме регистрации MRM-переходов, а в правой части — масс-спектры продуктов фрагментации лекарственного средства. Как видно, даже при максимальной скорости сканирования (30'000 а.е.м./с) не наблюдается снижение интенсивности сигналов, более того, высокие скорости сканирования и регистрации MRM-переходов (второе слева изображение) способствуют увеличению воспроизводимости получаемых результатов: чем выше скорость регистрации MRM-переходов, тем большее количество точек данных приходится на один пик целевого соединения.

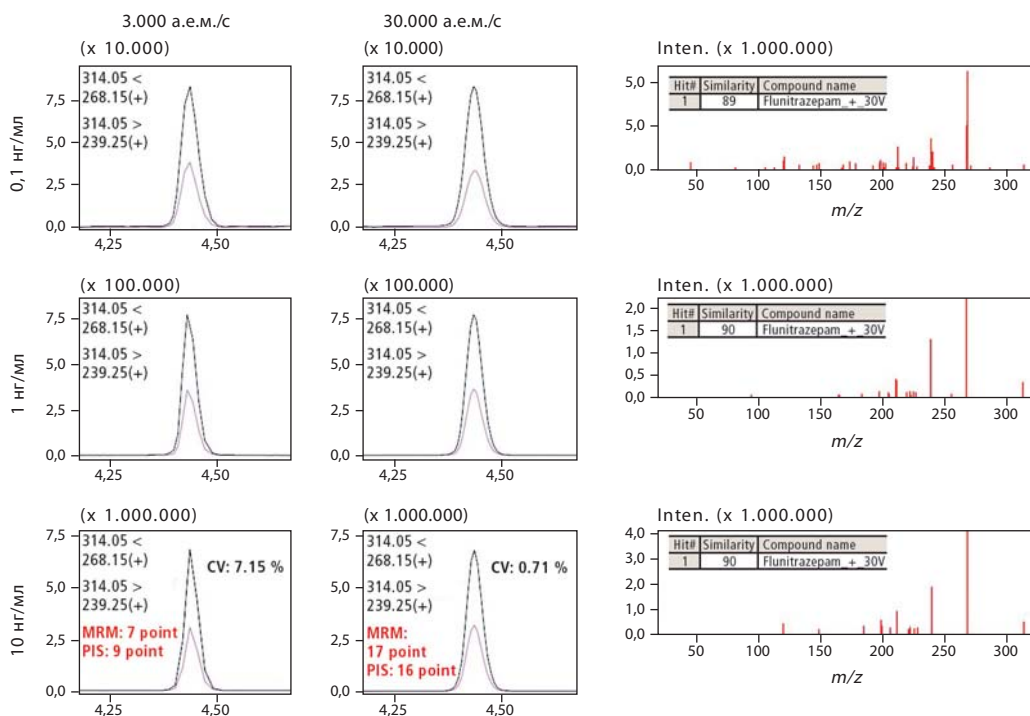


Рисунок 14: Определение флунизепема в цельной крови

Повышение эффективности работы

Для интенсификации и облегчения работы аналитических лабораторий жидкостные хроматомасс-спектрометры Shimadzu могут комплектоваться готовыми пакетами аналитических методик (Method Packages). Пакеты методик представляют собой комплексное решение аналитической задачи, включая метод-файлы с условиями хроматографического разделения и работы масс-спектрометра в режимах регистрации MRM-переходов и Production Scan и библиотеки масс-спектров продуктов фрагментации целевых соединений. В настоящее время пользователям предлагается более десяти вариантов пакетов методик для использования в различных областях: охрана окружающей среды, токсикология и судебная медицина, фармацевтика, биохимия и др.

Как правило, анализ образцов с помощью тандемной масс-спектрометрии предусматривает предварительную установку многочисленных параметров работы прибора и задание условий анализа, что может быть достаточно сложно для неподготовленного пользователя. Функция автоматической оптимизации условий регистрации MRM-переходов существенно сокращает и облегчает подготовку к исследованию. Теперь пользователю достаточно всего лишь указать интересующие целевые соединения. Программное обеспечение автоматически рассчитает массы соответствующих ионов (протонированные/депротонированные варианты и варианты с возможными аддуктами) и будет учитывать их в процессе автоматической оптимизации режима измерения (выбор дочерних ионов с максимальной интенсивностью сигнала в зависимости от энергии соударительной диссоциации).

Таким образом модель LCMS-8060 на сегодняшний день является, пожалуй, самым совершенным жидкостным тандемным масс-спектрометром на рынке и демонстрирует уникально высокие чувствительность и производительность в сочетании с выдающейся надёжностью и удобством эксплуатации.

Краткий обзор линейки оборудования Shimadzu для молекулярной спектроскопии

УФ-Вид-БЛИК спектрофотометры

Изначально спектрофотометры были разработаны для измерения поглощения жидких образцов и решения классических задач фотометрирования. Однако всё более востребованным становится измерение спектров отражения и поглощения твердых образцов, пленок, оптических материалов и ультра-следовых количеств образца.

Компания Shimadzu предлагает пять моделей спектрофотометров с высокой чувствительностью и скоростью сканирования.

UV-1280

Однолучевой сканирующий спектрофотометр UV-1280 позволяет реализовать любые спектрофотометрические методики в диапазоне 190-1100 нм. Встроенный USB-интерфейс и функция USB-контроля упрощают перенос данных на персональный компьютер или подключение принтера. В стандартный комплект поставки входят программные пакеты, которые позволяют проводить измерение основных фотометрических параметров во времени, исследовать кинетические процессы, определять концентрацию белка. При работе в фотометрическом режиме измерения можно проводить как при одной заданной длине волны, так и при выборе до 8 длин волн. Функция автоматического обнаружения полосы поглощения облегчает выбор оптимальной длины волны для последующих измерений. Встроенный процессор, клавиатура и большой дисплей делают работу с прибором простой и удобной. Большой выбор разнообразных аксессуаров и приставок расширяет функциональные возможности прибора.

UV-1900

Двухлучевой спектрофотометр UV-1900 в режиме ультрабыстрого сканирования позволяет проводить измерения со скоростью 29000 нм/мин — для измерений в видимом диапазоне спектра требуется около трех секунд. Ширина спектральной щели спектрофотометра UV-1900 составляет 1 нм, что соответствует требованиям к прибору, прописанным в ряде нормативных документов. Повторные измерения, исследование кинетики быстрых реакций занимают максимально короткое время. Монохроматор Черни-Тернера с запатентованной LO-RAY-LIGH® дифракционной решеткой гарантирует низкий уровень рассеянного излучения и один из самых больших диапазонов линейности. Высокая фотометрическая воспроизводимость обеспечивает точные количественные измерения даже очень разбавленных образцов. Уникальные характеристики прибора поддерживают философию компании «Excellence in Science». UV-1900 имеет большой сенсорный дисплей с крупными значками, которые обеспечивают интуитивное понимание встроенного программного обеспечения. Управлять UV-1900 можно также с помощью программного обеспечения нового поколения LabSolutions UV-Vis, что расширяет возможности пользователей из разных сегментов промышленности. Помимо функций измерения и анализа доступна возможность оценки результатов измерения (критерий соответствия / несоответствия). Простой экспорт данных в текстовый или табличный формат повышает эффективность работы. Сочетание спектрофотометра UV-1900 с программным обеспечением LabSolutions DB/CS позволяет интегрировать прибор в единую систему управления данными в соответствии с требованиями различных руководств и положений, касающихся электронных записей и электронных подписей.

UV-2600/2700 и UV-3600 Plus

Модели исследовательского класса UV-2600/2700 и UV-3600 plus отличаются уникальными характеристиками. Спектральный диапазон UV-2600 при использовании интегрирующей сферы ISR-2600 Plus можно расширить до 1400 нм в ближнюю ИК-область, а оснащенный двойным монохроматором UV-2700 позволяет работать с рекордно оптически плотными образцами (до 8 единиц оптической плотности). Модель UV-3600 Plus имеет широчайший спектральный диапазон: от 185 до

3300 нм, что позволяет проводить измерения как вблизи вакуумного ультрафиолета, так и глубоко в БИК-области спектра. Спектрофотометры оснащаются многочисленными приставками для работы в режимах поглощения и отражения, интегрирующими сферами разных диаметров для исследования порошковых, опалесцирующих, шероховатых образцов и стекла, термостабилизированными и проточными кюветами, многопозиционными держателями и т.д.

ИК-Фурье спектрометры

В 2016 году компания Shimadzu отметила 60-летнюю годовщину выпуска на рынок своего первого ИК-спектрометра. Неразрушающий анализ при определении дефектов на поверхности микросхем и других мелких деталей в электронике и полупроводниковой промышленности, идентификация веществ в фармацевтической, автомобильной промышленности и в органическом синтезе — высокочувствительные ИК-Фурье спектрометры Shimadzu справятся с этими, и ещё множеством задач ИК-спектроскопии. Широкий набор разнообразных приставок позволяет анализировать разные типы образцов. Линейка ИК-Фурье спектрометров Shimadzu включает три модели: компактный прибор IRSpirit, ИК-Фурье спектрометр среднего класса IRAffinity-1s и модель исследовательского класса IRTracer-100.

IRSpirit

Компактный ИК-Фурье спектрометр IRSpirit разработан для решения различных аналитических задач и демонстрирует новые возможности в сочетании с надежностью, унаследованной от моделей более высокого класса. Оптическая схема состоит из интерферометра Майкельсона и керамического источника света. Система динамической цифровой юстировки и высокая яркость источника света поддерживают эффективность оптической схемы. Модель IRSpirit оснащена детектором DLATGS с функцией контроля температуры и демонстрирует самое высокое в своем классе компактных приборов соотношение сигнал/шум 30000:1 (окошко KBr). Гибкость конфигурации достигается за счет доступности окошек из различных материалов, а также различных типов

детекторов. Площадь, которую занимает IRSpirit меньше листа бумаги формата А3, при этом спектрометр можно расположить фронтально или боком. Это позволяет работать в ограниченном пространстве, например, в перчаточных боксах. Кнопка включения прибора и индикатор влажности хорошо просматриваются с обеих сторон. Кюветное отделение IRSpirit также доступно с двух сторон и, несмотря на маленькие габариты прибора, имеет такие же размеры, как и у моделей более высокого класса: 200 (Ш) x 140 (Г) x 100 (В), мм. Стандартные размеры кюветного отделения обеспечивают совместимость с существующими аксессуарами Shimadzu и аксессуарами сторонних производителей. Параметрами измерения и обработки данных управляет программное обеспечение LabSolutions IR. Спектрометр IRSpirit имеет функцию контроля состояния прибора и функцию диагностики, что свойственно моделям более высокого класса. Функция автоматического распознавания аксессуаров помогает при выборе рабочих параметров. В ПО LabSolutions IR встроено специализированное вспомогательное программное обеспечение IRPilot. Оно включает 23 предустановленных метода, что упрощает анализ проб и экономит время при подборе условий анализа, особенно для операторов с минимальным опытом в ИК-спектроскопии. Настройка параметров измерения, запуск анализа и получение конечных результатов достигается одним щелчком мыши.

IRAffinity-1S

Надежный, компактный и удобный в эксплуатации спектрометр IRAffinity-1S обеспечивает решение широкого круга задач качественного и количественного анализа жидкостей, газов и твёрдых образцов. Интерферометр Майкельсона с системой динамической цифровой юстировки элементов, мощный керамический источник излучения с гарантированным сроком службы не менее 3-х лет и встроенный автоматический осушитель делают прибор надёжным и безотказным в эксплуатации. Соотношение сигнал/шум 30000:1 (для KRS-5, 4 см⁻¹, 1 мин, 2100 см⁻¹, пик к пику), максимальное разрешение 0,5 см⁻¹.

IRTracer-100

Высокая чувствительность исследовательского спектрометра IRTracer-100 (соотношение сигнал/шум 60000:1) позволяет проводить анализ следовых количеств примесей в различных образцах, несмотря на небольшую интенсивность интересующих полос в спектре. Спектральное разрешение IRTracer-100 равное $0,25 \text{ см}^{-1}$ обеспечивает высокую точность количественной идентификации полос в спектре, особенно в случае газообразных соединений. Система оптимизации работы интерферометра в совокупности с внутренней самодиагностикой обеспечивают стабильную работу прибора. Режим быстрого сканирования дает возможность регистрации до 20 спектров в секунду, что особенно актуально при исследовании кинетики быстрых реакций, время протекания которых может составлять несколько секунд. Прибор оснащается многочисленными приставками для работы в режимах пропускания, отражения, нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), для регистрации спектров диффузного рассеяния, для работы с твердыми образцами, порошками и тонкими пленками. Вывод внешнего луча позволяет комплектовать ИК-Фурье спектрометры Shimadzu IRAffinity-1S и IRTracer-100 ИК-микроскопом AIM-9000, который является высокоэффективным инструментом для микроанализа, использующегося в фармацевтической промышленности, электронике, криминалистике и т.д.

Программное обеспечение для ИК-Фурье спектрометров LabSolutionsIR

Параметрами измерения и обработки данных управляет программное обеспечение LabSolutions IR. Благодаря встроенным программным модулям по анализу примесей и идентификации веществ ПО LabSolutionsIR помогает решать конкретные узкоспециализированные задачи. Эти программные модули позволяют использовать ИК-Фурье спектрометры для идентификации чистых веществ и образцов с примесями. ПО LabSolutionsIR позволяет проводить и количественный анализ, а также включает дополнительную макрофункцию, которая помогает операторам персонализировать автоматизацию анализа. Чтобы реализовать все пожелания пользователей, в программное обеспечение можно интегрировать опциональные узкоспециализированные

библиотеки спектров или модуль для проведения кинетических исследований. Доступно уникальное дополнительное программное обеспечение EDXIR, которое объединяет измерения, полученные на ИК-Фурье спектрометре и энергодисперсионном рентгенофлуоресцентном спектрометре, для одновременного выявления органических и неорганических примесей в анализируемом образце. В дополнение к ПО LabSolutions IR с базовым функционалом, Shimadzu предлагает ПО LabSolutions DB IR и LabSolutions CS IR для соответствия требованиям ER/ES. ПО LabSolutions DB и LabSolutions CS имеют функции управления проектом, что позволяет свободно управлять данными каждой конкретной задачи или прикладной системы. Эти функции включают возможность контроля приборов, администрирование пользователей, политику безопасности, что повышает эффективность поиска и управления данными.

Константин Сергеевич Сычев

**Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок.
Поиск и устранение неполадок**

Редактор: *К.С. Сычев*

Формат 70x108/16. Тираж: 1000 экз.