

Особенности эксплуатации ВЭЖХ колонок

Методическое пособие

1. ЧТО ПРОИЗОШЛО ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКОЙ?	3
2. НЕОБХОДИМЫЕ ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ВЫСОКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ	5
2.1. Три основные причины приводящие к неисправностям колонки	5
3. ЗАГРЯЗНЕНИЕ КОЛОНКИ	7
3.1. Правильная эксплуатация обращённофазной колонки	8
3.2. Использование и своевременная замена предколонок	10
3.3. Показатели, свидетельствующие о выходе аналитической колонки из строя	10
4. ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО ГЕОМЕТРИЧЕСКОГО РАЗМЕРА КОЛОНКИ	12
4.1. Применение колонок с меньшим внутренним диаметром	12
4.2. Оптимизация выбора колонки меньшей длины	15
5. ЭКСТРА – КОЛОНОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ.	16
5.1. Экстра – колоночный объём.	16
5.2. Вклад капилляров.	17
5.3. Вклад детектора	19
5.3.1. Кювета детектора	19
5.3.2. Термостат детектора.	20
5.4. Вклад инъекционного объёма.	21
5.5. Минимизация экстраколоночных эффектов	21
4.5.2. Создание " надёжного метода ".	22
6. ИЗМЕНЕНИЕ СЕЛЕКТИВНОСТИ ПРИ ЗАМЕНЕ КОЛОНКИ	23
6.1. Причины изменения селективности.	23
6.2. Классификация изменений селективности.	24
6.3. Устранение изменений селективности	24
7. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ МЕЖДУ ПАРАЛЛЕЛЬНЫМИ ВВОДАМИ ПРОБЫ	24
7.1. Изменение удерживания и разрешения.	24
7.2. Выявление и устранение потерь эффективности колонки	25
7.3. Плохая воспроизводимость по удерживанию у систем градиентного элюирования	26
8. КАК РЕГЕНЕРИРОВАТЬ ЗАГРЯЗНЁННУЮ КОЛОНКУ.	28
8.1. Симптомы загрязнения колонки.	28
8.2. Процедура регенерации колонок	28
9. ЗАЩИТА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ	29
10. УХОД ЗА КОЛОНКАМИ И ИХ ХРАНЕНИЕ	30
10.1. Выбор подвижной фазы для хранения и работы на колонке	30
10.2. Подвижная фаза для хранения	31
11. ПРИЛОЖЕНИЕ 1	32
12. ПРИЛОЖЕНИЕ 2	34

1. Что произошло хроматографической колонкой?

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

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

При возникновении проблем приводящих к неисправности колонки необходимо предпринять своевременные грамотные действия по устранению ее причины, чтобы избежать этого в будущем.

Казалось бы, установление истинной причины является сложной задачей. На самом деле, число причин, приводящих к потере эффективности колонки, не столь велико.

В следующей таблице приведено несколько наиболее общих проблем, приводящих к неисправности колонки, вместе с возможными причинами и способами их грамотного устранения. Обращаясь к данной таблице, вы сможете точно определить причину, неисправности, и устранить её.

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

Причины не связанные с колонкой: неисправен тензопреобразователь, загрязнено устройство ввода пробы (инжектор), забит капилляр, загрязнена ячейка детектора, увеличена объёмная скорость.

Проблема: время удерживания одного и того же пика заметно (более чем на 10%) изменяется	
Возможная причина	Необходимые действия
1. Загрязнение колонки.	Промойте или замените колонку.
2. Потеря привитой фазы.	Замените колонку.
3. Колонка не уравновешена.	Промойте колонку подвижной фазой,

	объемом равным не менее чем семи геометрическим объемам колонки.
4. Колонка перегружена.	Снизьте количество вводимого образца.

Причины, не связанные с колонкой: изменен расход или состав подвижной фазы, колебания температуры.

Проблема: снижается эффективность (число теоретических тарелок)

Возможная причина	Необходимые действия
1. В колонке образовалось пустое пространство (проседание сорбента или образование канала).	Замените колонку.
2. "Износилась" предколонка.	Замените предколонку.

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

Проблема: пики "хвостят" или "двоятся".

Возможная причина	Необходимые действия
1. Загрязнена колонка.	Промойте или замените колонку.
2. Входной фрит колонки забит механическими примесями.	Замените входной фрит колонки.
3. Потеря привитой фазы.	Замените колонку.
5. Проседание сорбента	Замените колонку.
6. Образование канала в сорбенте	Замените колонку.
7. Износилась предколонка.	Замените предколонку.

Причины, не связанные с колонкой: экстраколоночные эффекты (поврежденные или неправильно установленные фитинги\ соединения), колонка перегружена, изменения состава подвижной фазы (концентрации буферного раствора, pH, количества ион – парного реагента и т.д.)

Проблема: неидентифицируемые («лишние») пики.

Возможная причина	Необходимые действия
1. Проба содержит много различных сопутствующих (в том числе не исследуемых) компонентов	Проверить калибровку, при необходимости переделать анализ методом добавки или внутреннего стандарта.
1. Загрязнена колонка.	Промойте или замените колонку.
2. Износилась предколонка.	Замените предколонку.

Причины, не связанные с колонкой: примеси в подвижной фазе, сопутствующие компоненты в пробе, воздушные пузырьки в хроматографической системе, электронные проблемы.

2. Необходимые действия для обеспечения высокой эффективности хроматографической колонки.

2.1. Три основные причины, приводящие к неисправностям колонки.

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

2.1.1. Потеря химически привитой фазы.

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

Причина: гидролиз силоксановых связей силикагелевой матрицы с привитыми группами или эндкапирующим реагентом, применяемым для устранения влияния остаточных силанольных групп на поверхности силикагеля. Гидролиз наиболее ярко выражен при использовании подвижных фаз с $pH < 3$ (см.рис.1).

Предотвращение: при необходимости применения сильноокислых подвижных фаз ($pH < 3$) следует использовать специально предназначенные для этого колонки (в том числе и с силикагельной матрицей), например, обращённофазные колонки серии Luna фирмы Phenomenex. Данные изделия способны стабильно работать в диапазоне pH 1,5 – 10 благодаря высокой чистоте используемого силикагеля и однородности его покрытия привитыми группами или же колонки на полимерной основе. Обычные же колонки, допускают работу с подвижными фазами, pH которых лежит в диапазоне 3 – 7. При работе вблизи нижней границы данного диапазона избегайте температур подвижной фазы выше 60 °С.

Параметры, по значениям которых оценивают состояние колонки: коэффициент ёмкости, селективность, коэффициент асимметрии. Расчет и оценка данных параметров приведены в разделе 2.4.

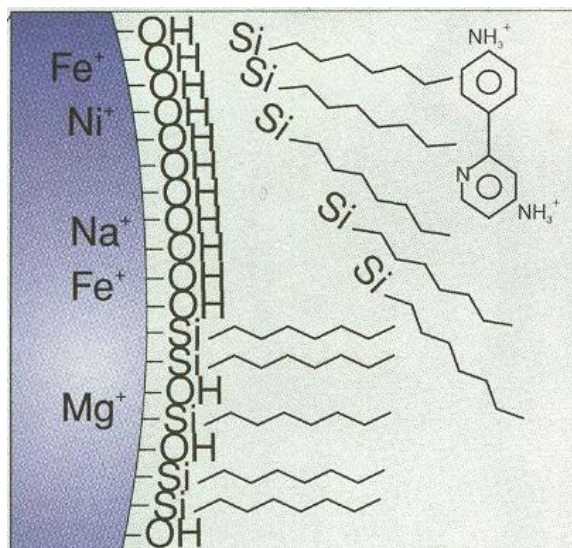


Рисунок 1. Гидролиз силоксановых связей обуславливает потерю привитой фазы.

2.1.2. Образование пустого пространства в колонке.

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

- Причины:**
- а) повышенное (более допустимого) давление на входе в колонку или гидравлический удар (одна из наиболее часто встречающихся причин), вызванный резким сбросом давления через кран сброса/готовности линии или входной фитинг колонки;
 - б) плохо набитые колонки, “проседающие” в процессе использования;
 - в) в результате использования подвижных фаз с высоким значением pH растворение силикагеля в колонке;

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

Приобретайте хроматографические колонки у надёжных и известных поставщиков, документально обеспечивающих качество своей продукции

(наличие паспорта и гарантий). Проседание сорбента вызванное плохой набивкой, как правило происходит в процессе первичной эксплуатации изделия, т.е. при тестировании производителем (поставщиком) или в период гарантийного срока.

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

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

Информативные параметры: число теоретических тарелок, коэффициент асимметрии.

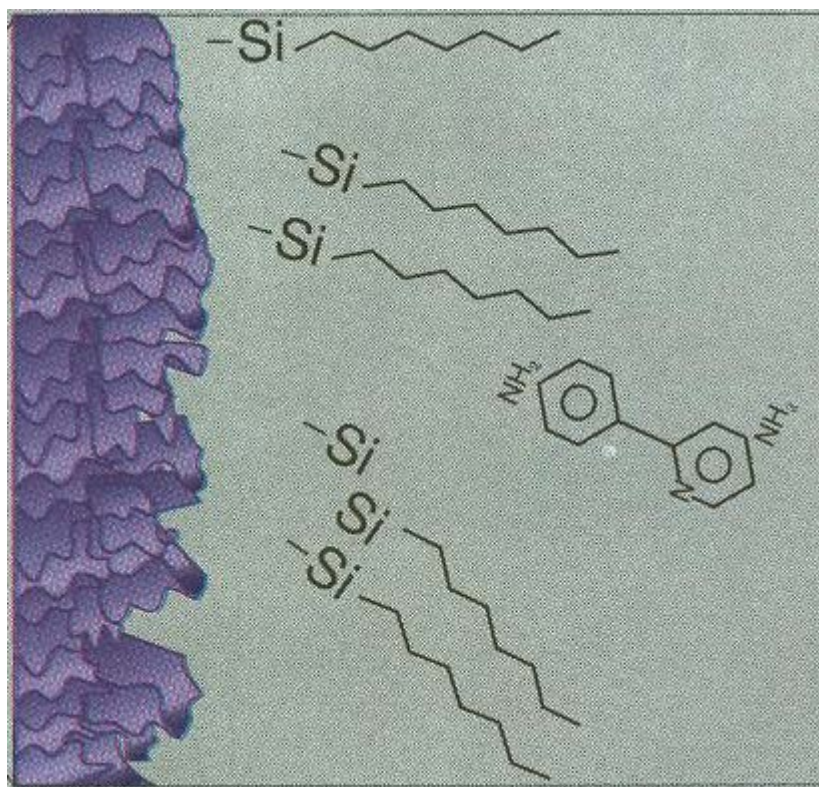


Рисунок 2. Полное растворение силикагелевой матрицы при $\text{pH} > 7$.

3. Загрязнение колонки.

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

буферных растворов также могут испортить колонку, забивая входной фрит или сорбент.

Причины: а) проба содержит компоненты, не смываемые с колонки подвижной фазой данного состава. Это часто наблюдается при использовании подвижных фаз с малым содержанием органического компонента.

б) примеси в подвижной фазе адсорбируются на неподвижной фазе колонки. Это часто происходит при использовании ион – парных реагентов или других добавок в сочетании с подвижной фазой с малым содержанием органической составляющей и изократическим режимом элюирования.

в) механические примеси в пробе или подвижной фазе, забивающие входной фрит колонки.

Предотвращение: Очистка образца перед инъекцией, подразумевающая фильтрацию или центрифугирование образца для удаления механических примесей и твердофазную экстракцию для удаления высоко удерживаемых компонентов пробы.

Используйте только особо чистые растворители и реактивы для подвижной фазы и не забывайте фильтровать буферные растворы.

По возможности откажитесь от применения ионпарных реагентов.

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

Для того чтобы смыть высоко удерживаемые примеси с неподвижной фазы колонки промойте её в течении продолжительного времени сильным растворителем (таким как 100% ацетонитрил)

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

Информативные параметры: число теоретических тарелок, коэффициент ёмкости, селективность, обратное давление.

3.1. Правильная эксплуатация обращённофазной колонки.

	Комментарии
Сводите к минимуму скачки давления в хроматографической системе	Ввод пробы осуществляйте резким поворотом ручки инжектора для снижения гидравлического удара. Обеспечьте наименьшую пульсацию насосов, вызванную, как правило непостоянной объёмной скоростью подвижной фазы (фаза не дегазирована). Избегайте гидравлических ударов.
Используйте предколонку и/или “ in-line” фильтр с диаметром пор 0,5 мкм.	Подсоедините их в линию между инжектором и аналитической колонкой. Фильтр задержит крупные

	механические частицы, а предколонка предотвратит попадание сильно удерживаемых примесей на аналитическую колонку.
Как можно чаще промывайте колонку сильным растворителем.	Обычно бывает достаточно промыть колонку 100% ацетонитрилом. Тем не менее, если необходим более сильный (менее полярный) растворитель, то можно применить метиленхлорид, являющийся одним из наиболее сильных растворителей в обращённофазной хроматографии. При перебивке помните о совместимости растворителей и возможности образования осадков. Многие сильные органические растворители не смешиваются с водными подвижными фазами и буферами, поэтому перед и после использования метиленхлорида необходимо промыть колонку изопропанолом.
Перед вводом “грязной” пробы в колонку необходимо провести пробоподготовку для удаления механических частиц и сильно удерживающихся на колонке примесей.	В качестве пробоподготовки используйте такие приёмы, как твердофазная экстракция, фильтрация через пористый 0,45 мкм фильтр и центрифугирование.
Колонки на силикагелевой основе используйте с подвижными фазами, рН которых лежит в диапазоне от 3 до 7.	Для работы за пределами данного диапазона используйте специально предназначенные для этого силикагелевые колонки или колонки на полимерной основе.
При работе с буферными растворами используйте только свежеприготовленные буферы. Если это невозможно добавляйте в ёмкость 100 – 200 мг/л азид натрия для предотвращения роста бактерий.	Долго стоящие водные растворы быстро “зацветают”, что приводит к нестабильности базовой линии и загрязнению колонки. Помните, что азид натрия очень ядовит и по токсичности сопоставим с цианидами.
Перед хранением или транспортировкой колонки отмойте её от солей и буферных растворов и оставьте в чистом ацетонитриле.	Это предотвратит выпадение осадков и рост бактерий в колонке. Кроме того, ацетонитрил является хорошим растворителем для хранения, в отличие от водных и спиртовых смесей, способных ускорять гидролиз неподвижной фазы.

3.2. Использование и своевременная замена предколонок.

Основная роль, которую играет предколонка в Вашей хроматографической системе – роль ловушки сильно удерживающихся на аналитической колонке примесей и механических частиц. Она устанавливается в линии между инжектором и аналитической колонкой. Защищая при помощи предколонок свою аналитическую колонку, Вы существенно продлеваете срок ее службы. При этом, не меньшее значение имеет своевременная замена износившейся предколонок.

Не смотря на то, что точно определить необходимость замены предколонок при работе с данным образцом и подвижной фазой можно лишь при наличии соответствующего опыта, существует несколько количественных параметров, способствующих принятию верного решения. Среди них: число теоретических тарелок N , давление P , разрешение R_s ,

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

Даже не смотря на то, что вышеперечисленные параметры являются достоверными критериями принятия решения о замене предколонок, нельзя быть на сто процентов уверенным в том, что предколонка должным образом защищает Вашу аналитическую колонку. Аналитическая колонка может загрязняться из-за перенасыщения предколонок и без видимого изменения вышеперечисленных параметров. Поэтому лучше произвести замену предколонок как можно раньше.

В отсутствие иной информации хорошей привычкой является замена предколонок после 150 вводов пробы или 1000 объёмов подвижной фазы (в зависимости от того, что быстрее произойдёт).

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

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

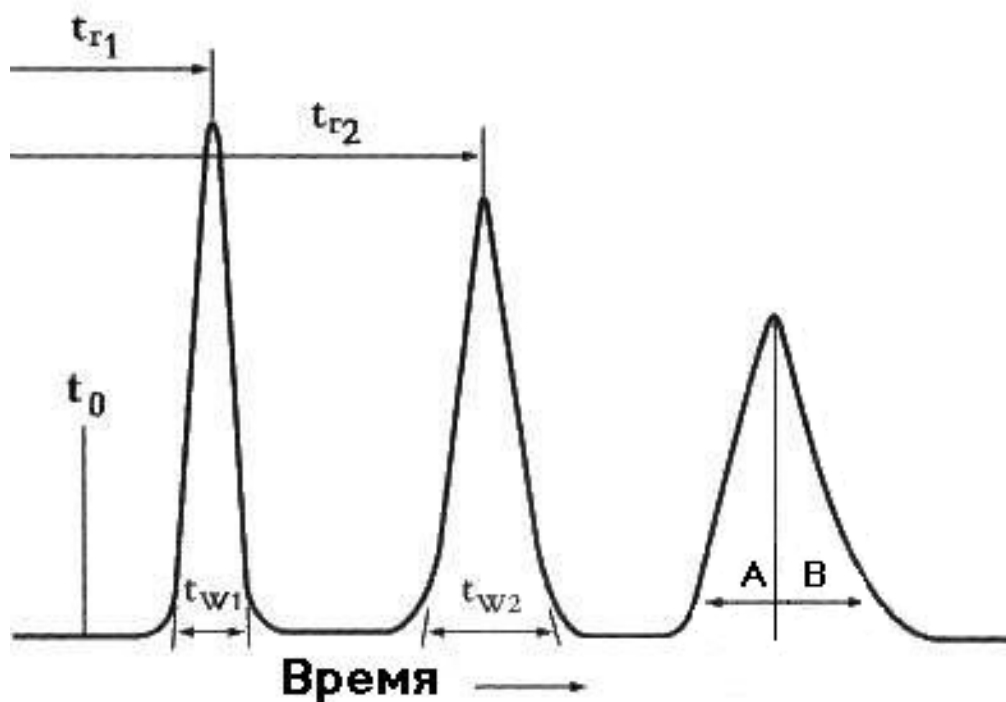


Рисунок 3. Основные хроматографические параметры, где:

$$N = 16 (t_r / t_w)^2 \quad k = (t_r - t_0) / t_0$$

$$\alpha = k_2 / k_1 \quad (*)A_s = A / B$$

- - измерено на расстоянии 10% высоты пика от базовой линии

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

	удерживание. Изменение селективности являются ещё одним свидетельством наряду с коэффициентом ёмкости, смывания привитой фазы, загрязнения колонки или изменения состава подвижной фазы.
Коэффициент асимметрии, A_s .	Коэффициент асимметрии является мерой симметричности пика. Увеличение коэффициента асимметрии (появление “хвоста”) пика указывает на возможное образование полости в колонке, но также может быть вызвано взаимодействием полярного образца с силанольными группами силикагеля в результате смывания привитой фазы.
Обратное давление колонки, ΔP .	Увеличение обратного давления колонки указывает, как правило, на то, что входной фрит забился механическими частицами. Как бы то ни было, резкое увеличение обратного давления может быть вызвано образованием полости в результате разрушения упаковки колонки.

4. Выбор оптимального геометрического размера колонки.

Многие хроматографисты изначально отдают предпочтение колонкам 250 x 4,6 мм для разработки метода разделения, так как они обеспечивают прекрасное разрешение и приемлемое время анализа. Когда речь идёт о разработке метода для рутинного анализа необходимо рассмотреть все возможные варианты для выбора единственного, обеспечивающего наименьшие время и стоимость анализа.

4.1. Применение колонок с меньшим внутренним диаметром.

Доступность аналитических колонок с внутренним диаметром менее 4,6 мм обеспечивает хроматографисту возможность разработать более экономичный метод. Колонки с внутренним диаметром 3,0мм и 2,1мм обладают рядом преимуществ:

снижение расхода подвижной фазы

- меньшие затраты элюента
- меньшая стоимость анализа

минимизация ввода образцов, количество которых ограничено

- колонки с внутренним диаметром 3мм допускают уменьшение количества вводимого вещества приблизительно в 2 раза;
- колонки с внутренним диаметром 2.1мм допускают уменьшение количества вводимого вещества приблизительно в 5 раз;

снижение объёма пробы

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

лучшая совместимость со специфическими детекторами

- ЖХМС
- ЖХЯМР

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

4.1.1. Зависимость расхода подвижной фазы от внутреннего диаметра колонки.

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

Таблица 1.

Размеры колонки, мм	«Мертвый» объём колонки, мл	Объём пика, мкл	Потребление элюента, мл	Сэкономленный элюент, %
4,6 x 250	2,50	550	18,9	0
4,6 x 150	1,50	430	11,4	40
3,0 x 250	1,06	240	8,0	58
3,0 x 150	0,64	188	4,8	74
2,1 x 150	0,3	94	2,4	87

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

4.1.2. Оптимизация эффективности колонок с малым внутренним диаметром.

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

Хорошо сконструированная ВЭЖХ система способна обеспечивать высокую эффективность даже при объёме пика 80 мкл. Как бы то ни было, для пиков с объёмом менее 80 мкл требуется особым образом сконфигурированная ВЭЖХ система. Стандартные колонки 4,6 мм, а также 3 мм могут применяться практически с любой ВЭЖХ хроматографом и обуславливать оптимальную эффективность. Что касается колонок с малым диаметром 2,1 мм, то они требуют дополнительной оптимизации ВЭЖХ системы для обеспечения должной эффективности (см. раздел 4). Микроборные колонки (внутренний диаметр менее 2,1мм) могут использоваться только в специальных усложнённых системах, мало распространённых на сегодняшний день в лабораториях, так как на самом деле требуют не только оптимизации прибора, но и совершенно иных технологий синтеза и набивки сорбента.

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

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

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

Например, при переходе от колонки 250 x 4,6 мм к колонке 250 x 3 мм объёмная скорость должна быть умножена на 0,4, так – как:

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

Результаты соответствующих расчётов при переходе от колонки 250 x 4,6 мм к колонкам с меньшими внутренними диаметрами приведён в таблице 2:

Таблица 2.

Размеры колонки, мм	Относительная объёмная скорость, мл\мин
4,6 x 250	1,0
3,0 x 250	0,4
2,1 x 250	0,2

4.2. Оптимизация выбора колонки меньшей длины.

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

4.2.1. Изменение разрешения (Rs).

Разрешение, R_s , прямо пропорционально квадратному корню числа теоретических тарелок N . А так как число теоретических тарелок N изменяется пропорционально изменению длины колонки, то разрешение будет изменяться пропорционально квадратному корню изменения длины колонки:

$$R_{s2} = R_{s1} \times (L_2/L_1)^{0.5}$$

Где: R_{s2} – разрешение второй колонки
 R_{s1} – разрешение первой колонки
 L_2 - длина второй колонки
 L_1 - длина первой колонки

4.2.2. Изменение времени анализа и перепада давления.

По аналогии с разрешением мы можем предсказать, как изменяться время анализа (T) и перепад давления (ΔP) с изменением длины колонки:

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

T_1 - время анализа на первой колонке

T_2 - время анализа на второй колонке

P_1 – давление на первой колонке

P_2 – давление на второй колонке

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

$$R_{s2} = 3.5 \times (15/25)^{0.5} = 2.7$$
$$T_2 = 20 \text{ мин} \times 15/25 = 12 \text{ мин}$$
$$P_2 = 70 \text{ бар} \times 15/25 = 42 \text{ бар}$$

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

5. Экстра – колоночные эффекты.

5.1. Экстра – колоночный объём.

" Экстраколоночные эффекты " - с появлением новых видов колонок этот термин приходится слышать всё чаще. В этой связи в данном разделе мы обсудим, что обозначает этот термин, почему экстраколоночные эффекты важны, и как они могут влиять на процесс хроматографического разделения. Экстраколоночные эффекты находятся в тесной взаимосвязи с числом теоретических тарелок N. Имея представление об эффективности колонки, появляется возможность контроля вклада экстраколоночных эффектов для сохранения необходимого количества разделения (R_s).

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

$$V_{obs} = \sqrt{V_{col}^2 + V_{ec}^2 + V_{spl}^2},$$

Где: **V_{obs}** – наблюдаемая ширина пика в единицах объёма

V_{col} – объём колонки

V_{ec} – экстра – колоночный объём

V_{spl} – объём образца

Под экстраколоночным объёмом («мертвым» объёмом) следует понимать сумму инъекционного объёма, объёма " in-line фильтра " и объёмов капилляров и соединений между инжектором и колонкой, а также колонкой и ячейкой детектора (см. рис 3).. Согласно железному правилу хроматографии, экстра – колоночный объём в хроматографической системе должен быть сведён к минимуму для достижения оптимальной эффективности.

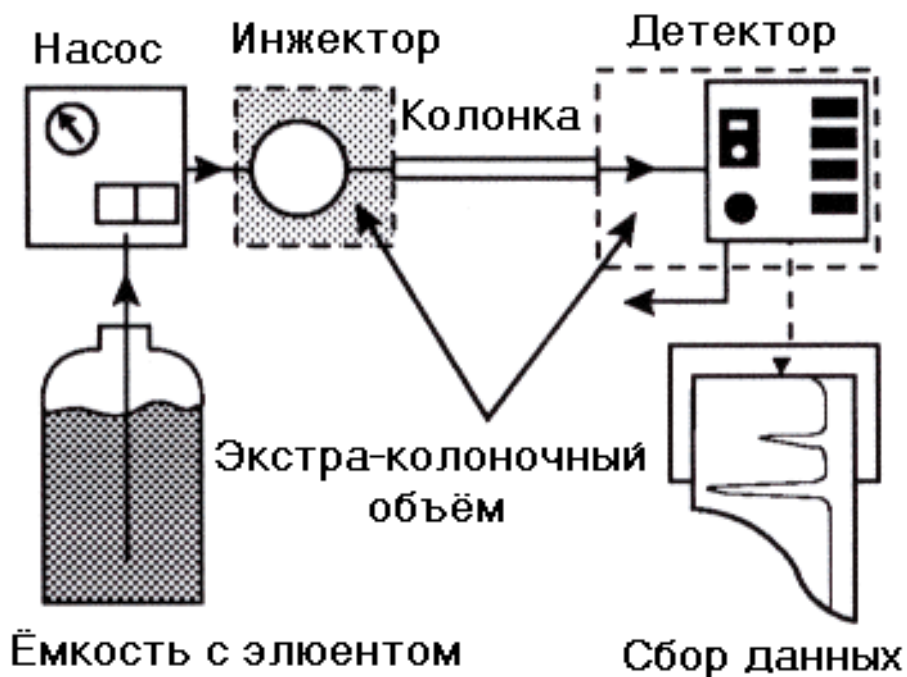


Рисунок 4. Экстра – колоночный объём.

Существует два свидетельства существования чрезмерного экстра – колоночного объёма в ВЭЖХ системе для данной колонки:

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

5.2. Вклад капилляров.

Капилляр любого объёма, через который проходит образец, обуславливает смешение и, следовательно, размывание пиков, внося свой вклад в величину $V_{\text{ес}}$. Поток в прямом капилляре проявляет ламинарный характер и имеет характерный параболический профиль, приводящий к дисперсии образца (см.рис.4).

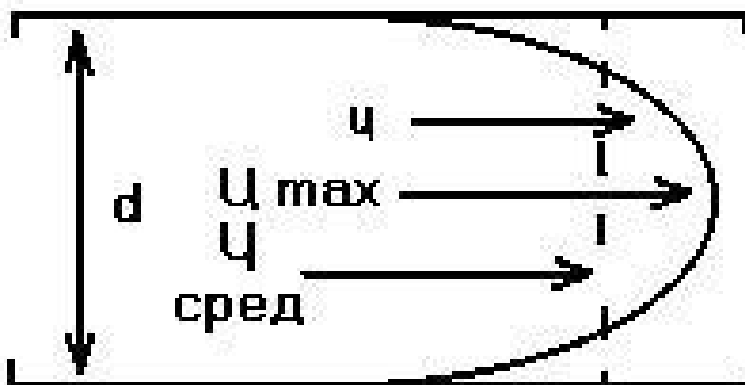


Рисунок 5. Ламинарный поток в прямом капилляре.

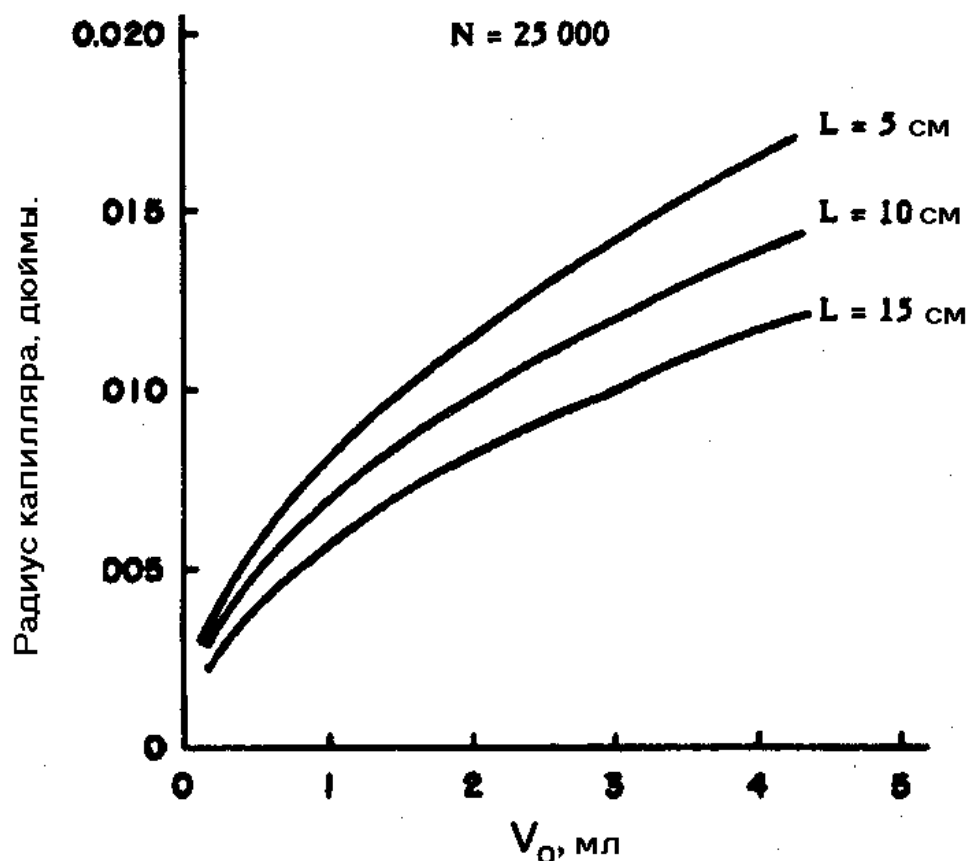
$$\sigma^2 = 1,26 \times 10^{-3} d^4 LF/D, \text{ где}$$

- σ - дисперсия
- d – внутренний диаметр капилляра
- L –длина капилляра
- F – скорость потока
- D – коэффициент поперечной диффузии

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

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

Рисунок 6. Взаимосвязь радиуса соединительных капилляров разных длин и мёртвого объёма колонки (V_0) (1 " (дюйм) = 25.4мм).



Использование “ in-line“ фильтров и предколонок между инжектором и колонкой также может быть источником экстра – колоночного размывания пиков. При использовании таких фильтров всегда убедитесь в отсутствии у них большого мёртвого объёма. Сорбент предколонки должен быть подобран таким образом, чтобы число теоретических тарелок комбинации предколонка – аналитическая колонка не было меньше, чем у одной аналитической колонки.

5.3. Вклад детектора.

5.3.1. Кювета детектора

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

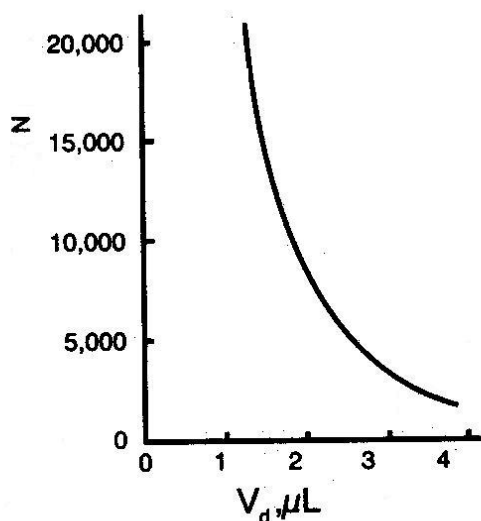


Рисунок 7. Влияние объёма кюветы детектора (V_d) на эффективность колонки (N).

Несмотря на то, что эффективность микроборных (с внутренним диаметром ≤ 1 мм) колонок увеличивается при использовании кювет малого объёма, следует помнить, что меньший объём кюветы в целом означает меньшую чувствительность, так как выходной сигнал спектрофотометрического детектора прямо пропорционален длине оптического пути (ячейки малого объёма, как правило, короче). Это же правило минимизации объёма кювет справедливо и для других оптических детекторов (кроме рефрактометров). Из этого следует, что

маленькие ячейки (< 8 мкл) должны использоваться только при крайней необходимости в минимизации дисперсии (см. таблицу 3).

Таблица 3.

Потеря эффективности, вызванная ячейками с большим объемом			
Размеры колонки, мм	Объем ячейки, мкл	Эффективность, N/м	Потеря эффективности, %
150 x 4,6	1	98096	--
	8	90888	7
150 x 2,0	1	78077	--
	8	52939	32
150 x 1,0	1	56551	--
	8	16277	67

5.3.2. Термостат детектора.

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

5.3.3. Влияние колонки

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

Таблица 3.

Размер колонки, мм	Диаметр частиц, мкм		
	10	5	3
	Объем пика, мкл		
250 x 4,6	291	206	159
150 x 4,6	225	159	123
100 x 4,6	183	129	100

5.4. Вклад инъекционного объёма.

В тех случаях, когда образец растворён в подвижной фазе (или более слабом растворителе, чем подвижная фаза) и инъекционный объём его составляет 10 – 50мкл, вклад образца в размывание пиков несущественен, если используются стандартные колонки 150 или 250 x 4,6мм. Если же в колонку вводятся образцы гораздо большего объёма, чем 50мкл или образцы свыше 25 мкл, растворённые в сильных растворителях, возможно снижение числа теоретических тарелок за счёт ряда инъекционных эффектов, например, искривление или расщепление пиков. Чтобы выявить это, следует уменьшить объём вводимого в колонку образца до 10-20 мкл, настроить детектор таким образом, чтобы высота пиков осталась прежней и проверить N и Rs интересующего пика. Необходимость изменения процедуры анализа возникает в том случае, если с уменьшением объёма вводимого образца (меньший инъекционный объём и/или более слабый растворитель для образца) заметно возрастают N или Rs, влияющие на точность или воспроизводимость анализа. Вклад инъекционного объёма в размывание пиков становится более серьёзным в случае колонок с меньшим объёмом или для пиков с малыми k' (см. рис. 3). Для того, чтобы поддерживать необходимую эффективность (в данном случае N = 10000 и 25000) максимальный введённый объём образца не может превышать мёртвый объём колонки, не вызвав при этом размывания пиков и ухудшения разделения. Чтобы не потерять эффективность необходимо вводить образец меньшего объёма в колонки с меньшим мёртвым объёмом. Более того, более эффективные колонки менее устойчивы к большим объёмам пробы и легче перегружаются.

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

Таким образом, чтобы произвести оптимизацию ВЭЖХ системы необходимо запомнить следующие общие правила:

Объём ячейки детектора: $\sim 1/10$ объёма пика

Инъекционный объём: $\sim 1/10$ объёма пика

Коммуникации: общее стремление к минимизации длины и диаметра.

5.5. Минимизация экстраколоночных эффектов.

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

А) следовать вышеприведённым советам по оптимизации ВЭЖХ системы

Б) работать в той области хроматограммы, где экстра – колоночные эффекты минимальны

В) создать такой метод разделения, при котором экстра – колоночные эффекты не имели бы большого значения.

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

4.5.1. Оптимизация коэффициента ёмкости для снижения влияния экстраколоночных эффектов.

Увеличение объёма кюветы детектора гораздо более ощутимо для пиков легко удерживаемых компонентов (компонентов с низким k'). Это связано с тем,

что поздние пики имеют больший объём и, следовательно, меньше подвержены влиянию экстра – колоночных эффектам. Данное обстоятельство следует использовать как преимущество, если создать метод разделения, при котором критические пики имели бы k' больше 4. В первую очередь это касается микроборных и коротких колонок, а также колонок с мелким размером частиц сорбента.

4.5.2. Создание “ надёжного метода “.

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

4.5.3. Выявление экстра – колоночных эффектов.

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

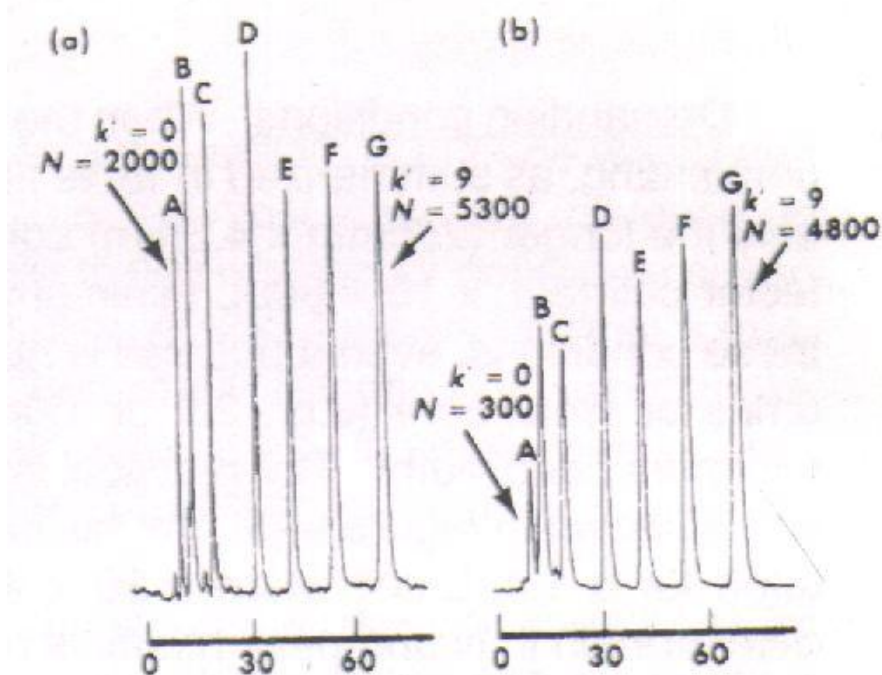


Рисунок 8. Экстра – колоночные эффекты.

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

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

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

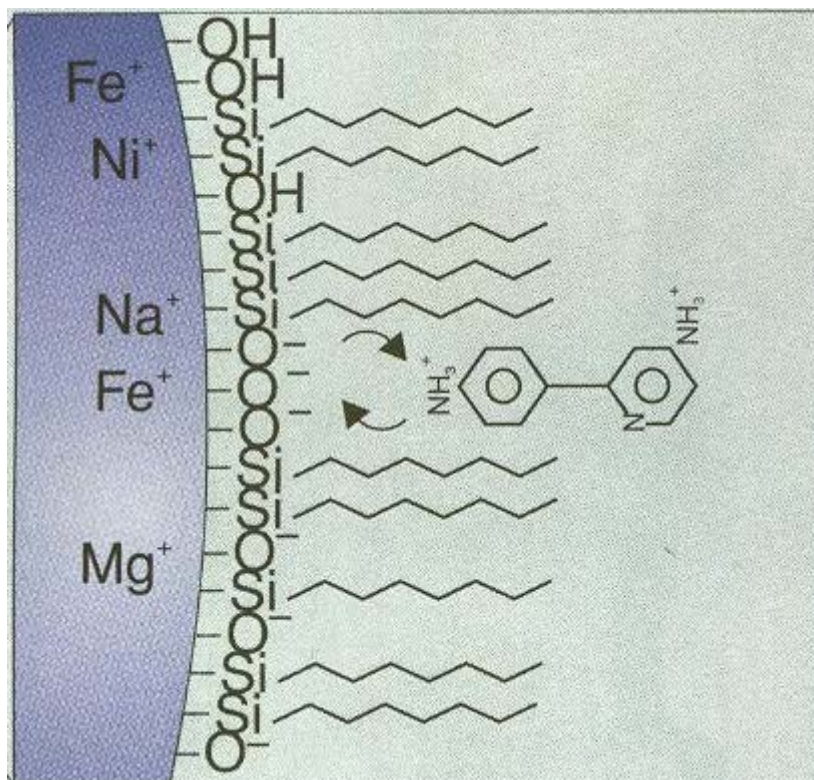
6. Изменение селективности при замене колонки.

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

6.1. Причины изменения селективности.

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

Рисунок 9.
Депротонирование остаточных силанольных групп на поверхности силикагеля.



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

6.2. Классификация изменений селективности.

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

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

6.3. Устранение изменений селективности.

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

7. Воспроизводимость между параллельными вводами пробы.

7.1. Изменение удерживания и разрешения.

Если время удерживания (t_r) или разрешение (R_s) пиков не воспроизводятся от анализа к анализу и даже ото дня ко дню, то точность данного ВЭЖХ метода не может считаться удовлетворительной. Плохая воспроизводимость вызвана как правило либо изменениями в условиях хроматографирования, либо изменением эффективности колонки (см. таб.4).

Таблица 4. Причины плохой воспроизводимости.

Изменения условий хроматографирования.	Изменения эффективности колонки.
Изменение подвижной фазы: <ul style="list-style-type: none"> - рН - процент органической составляющей - концентрация буферного раствора - концентрация добавок (ион – парного реагента) - профиль градиента 	Недоуровневешивание
	Перегрузка
Изменение температуры	Загрязнение колонки
Изменение скорости потока	Потеря привитой фазы

7.2. Выявление и устранение потерь эффективности колонки.

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

Таблица 5 . Устранение плохой воспроизводимости по удерживанию.

Причины плохой воспроизводимости	Симптомы	Необходимые действия
Недоуровневешанная колонка	<ul style="list-style-type: none"> - постоянное увеличение или уменьшение времён удерживания - неправильная форма пика 	1) Уделяйте больше времени уравниванию колонки. Перед вводом пробы промойте колонку как минимум 15 объёмами подвижной фазы (35 мл для колонки 250 x 4,6мм) 2) Если для анализа необходим слабый элюент, промойте колонку сначала более сильным растворителем.

Загрязнённая колонка.	<ul style="list-style-type: none"> - продолжительное уменьшение времени удерживания - неправильная форма пика - увеличивающееся давление (возможно) 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Промойте колонку обратным током сильным растворителем с расходом в 5 раз меньшим по сравнению с рабочим 2) Если промывка не помогает, замените колонку 3) В следующий раз используйте предколонку
Потеря привитой фазы	<ul style="list-style-type: none"> - систематическое изменение (обычно уменьшение) времён удерживания - неправильная форма пика 	<ol style="list-style-type: none"> 1) замените колонку, если она больше не удовлетворяет вашим запросам 2) используйте специальные колонки, стабильные в широком диапазоне pH
Перегрузка колонки	<ul style="list-style-type: none"> - уменьшение времени удерживания при увеличении массы введённого образца - “хвостящие” пики 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Разбавьте пробу перед вводом 2) Подберите колонку с большим внутренним диаметром

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

7.3. Плохая воспроизводимость удерживания в системах градиентного элюирования.

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

7.3.1. Недоуравновешанная колонка

Стандартная колонка 250 x 4,6 имеет внутренний объём приблизительно 2,5мл и требует, по крайней мере, 10 – 15 объёмов подвижной фазы для достижения состояния равновесия. Это необходимо учитывать при составлении программы градиента. Самая распространенная ошибка заключается в том, что

по окончании градиентного элюирования колонку либо забывают смыть сильной фазой, либо после смывки задают недостаточное время для достижения равновесия, необходимое для начала следующего анализа, либо то и другое одновременно.

7.3.2. Загрязнение колонки сильно удерживаемыми веществами.

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

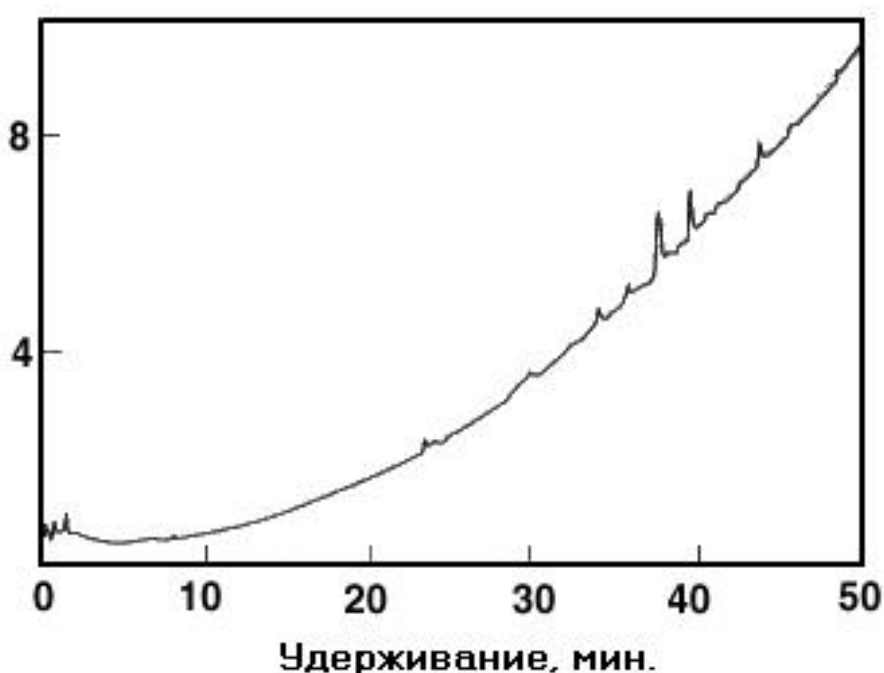


Рисунок 10. Холостой анализ, выявивший сильно удерживаемые примеси в пробе. Без ввода пробы. 0 – 100% метанола за 50 минут. Расход: 2 мл/мин.

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

7.3.3. Плохая воспроизводимость смешения компонентов.

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

8. Как регенерировать загрязнённую колонку.

8.1. Симптомы загрязнения колонки.

Многие методы разделения используют изократический режим элюирования. При этом подвижная фаза (постоянного состава) обладает недостаточной элюирующей силой для того, чтобы смыть сильно удерживающиеся (не анализируемые) компоненты пробы с колонки. В результате накопления несмываемых примесей на сорбенте эффективность колонки будет постепенно ухудшаться.

Основными симптомами загрязнения колонки являются:

- увеличение перепада давления
- изменение времён удерживания
- широкие и/или “хвостящие” пики
- потеря разрешения

8.2. Процедура регенерации колонок.

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

8.2.1. Регенерация обращённофазных колонок (для колонок с внутренним диаметром 4.6 мм).

8.2.2.

1. Подсоедините колонку к хроматографу в противоположном направлении.
2. Промойте колонку от буферных растворов и солей обратным током 25 мл воды со скоростью 0.2-0.3 мл/мин.
3. Промойте колонку 25 мл изопропанола с расходом 0.2-0.3 мл/мин
4. Промойте колонку 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0.5 мл/мин
5. Промойте колонку 25 мл гексана с расходом не более 0.5 мл/мин.
6. Промойте колонку ещё раз 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0.5 мл/мин.
7. Промойте колонку ещё раз 25 мл изопропанола с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
8. Подсоедините колонку в обычном направлении. Промойте колонку подвижной фазой, не содержащей буферного раствора, только после этого добавьте в подвижную фазу буферный раствор с рабочим расходом.

9. Приведите колонку в равновесие 25 – 50 мл подвижной фазы.
10. Введите пробу или стандарт чтобы убедиться, что колонка регенерирована.

Для колонок меньшего диаметра соблюдайте пропорциональное снижение расходов.

8.2.2. Регенерация нормальнофазных колонок (для колонок с внутренним диаметром 4.6 мм).

1. Подсоедините колонку к хроматографу в противоположном направлении.
2. Промойте колонку обратным током 50 мл смесью метанол – хлороформ с расходом 0.2-0.3 мл/мин
3. Промойте колонку 50 мл этилацетата с расходом 0.5 мл/мин.
4. Подсоедините колонку в обычном направлении.
5. Приведите колонку в равновесие 50 мл подвижной фазы.
6. Введите пробу или стандарт чтобы убедиться, что колонка регенерирована.

9. Защита хроматографической колонки.

Накапливание сильно удерживаемых примесей на сорбенте колонки может существенно сократить срок ее службы. Сокращая активную площадь поверхности неподвижной фазы, эти примеси вызывают смещение времён удерживания, ухудшение разрешения и формы пиков. Наилучшим способом защиты аналитической колонки от подобного рода загрязнений является установка предколонки в линию между инжектором и аналитической колонкой. Рекомендуется использовать предколонки с сорбентом аналогичным сорбенту в аналитической колонке. При этом предколонки должны быть просты в использовании и не должны снижать эффективность аналитической колонки. Для того чтобы определить, подходит ли Вам та или иная предколонка необходимо провести анализ с предколонкой и без неё. Число теоретических тарелок N для пика, полученного в результате анализа с предколонкой не должно сокращаться более чем на 5 % числа теоретических тарелок пика, полученного только на аналитической колонке. Ещё одним важным параметром предколонки является её мёртвый объём. Современные предколонки состоят из универсального держателя и сменного картриджа (см.рис.11). Такая конструкция позволяет максимально снизить мёртвый объём. Кроме того, один и тот же держатель может использоваться как со стандартными колонками (4,6 и 3 мм), так и с колонками с малым внутренним диаметром (2,1мм).

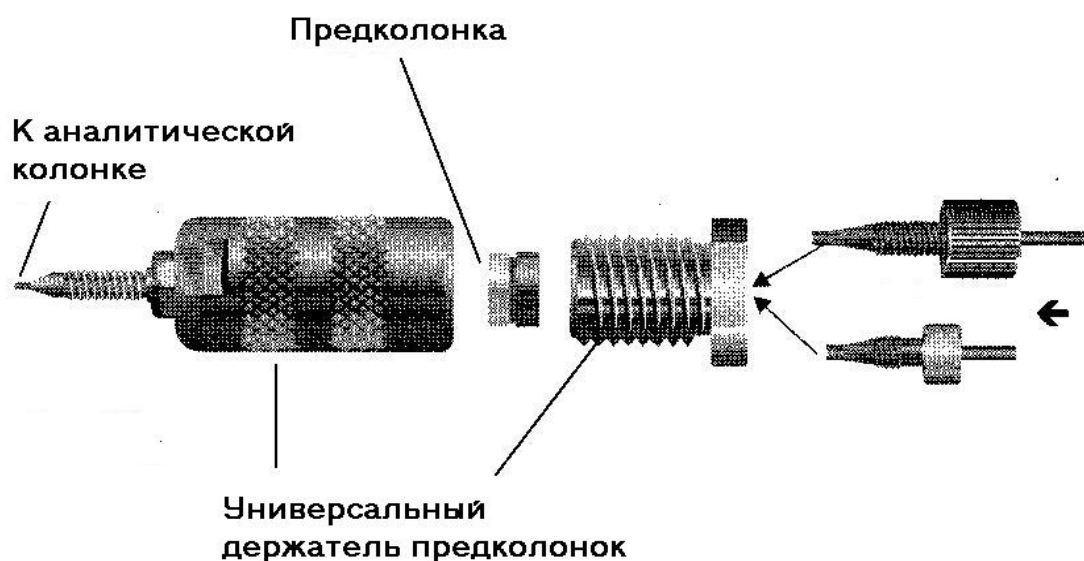


Рисунок 11. Универсальный держатель картриджной предколонки производства фирмы Phenomenex.

10. Уход за колонками и их хранение

Одним из наиболее важных моментов при эксплуатации колонок являются уход за ними и их хранение. Правильный уход за колонкой способен значительно продлить срок ее службы. Кроме того, обслуживание колонок не является обременительной задачей. Ниже приведённая информация поможет Вам найти ответы на большинство вопросов относительно правильного ухода и хранения колонки.

10.1. Выбор подвижной фазы для хранения и работы на колонке.

10.1.1. Подвижная фаза для работы на колонке.

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

- 2) Выбирайте подвижную фазу таким образом, чтобы она попадала в рабочий диапазон рН данной колонки. Водородный показатель подвижной фазы определяется только в водном растворе, не смешанным с органическим модификатором.
- 3) Перед тем, как начать работу на новой колонке, убедитесь в том, что раствор для хранения и транспортировки, под которым она находится, смешивается с Вашей подвижной фазой. Никогда не начинайте работать на обращённофазной колонке, если она находится под 100% органическим растворителем, а Ваша подвижная фаза содержит буферный раствор. Сначала промойте колонку подвижной фазой без буферного раствора, а затем добавьте в неё буферный раствор и приведите колонку в равновесие.

10.2. Подвижная фаза для хранения.

Никогда не оставляйте колонку на хранение, если она находится под буферным раствором, так как он может выпасть в осадок и испортить колонку. Буферный раствор может также вызвать рост бактерий и привести тем самым в негодность фриты и сорбент. Это наиболее вероятно при высоких содержаниях в фазе буферных растворов. Кроме того, мёртвые бактерии могут вызвать появление неидентифицируемых пиков на хроматограмме.

Не храните колонку под растворителями, которые легко разлагаются, например, тетрагидрофураном (ТГФ), триэтиламином (ТЭА) и трифторуксусной кислотой (ТФУ). В результате распада ТГФ образуются пероксиды, губительных для колонки. ТЭА и ТФУ могут быть загрязнены примесями, если хранились без холодильника.

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

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

10.2.2. Длительное хранение.

- 1) Промойте колонку на тот растворитель, под которым она находилась первоначально. Если рабочая подвижная фаза содержала буферный раствор, то сначала промойте колонку рабочей подвижной фазой, не содержащей буферного раствора (см.п.1.2.1.), а затем растворителем для длительного хранения.
- 2) Обращённофазные колонки можно хранить под 100% ацетонитрилом. Если рабочая подвижная фаза содержала буферный раствор, то сначала промойте колонку рабочей подвижной фазой, не содержащей буферного раствора (см.п.1.2.1.), а затем 100% ацетонитрилом. Кроме того, промывка 100% ацетонитрилом способствует удалению сильно удерживаемых примесей с колонки.

11. Приложение 1.

МАТЕРИАЛЫ КОЛОНОК И КОММУНИКАЦИЙ: ПРЕИМУЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ

Титан (Ti)

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

ИЗБЕГАЙТЕ: Азотной кислоты

316 Нержавеющая сталь (SS316)

Нержавеющая сталь обладает превосходными физическими и механическими характеристиками для ВЭЖХ, а также выдерживает высокие температуры, но вытравляется кислотными подвижными фазами. Колонки из нержавеющей стали для аналитической ВЭЖХ с толщиной стенки, способной выдерживать давление вплоть до 12000 psi (816 атм) во время упаковки сорбентом. 316 нержавеющей сталь способна выдерживать водные растворы с широким диапазоном pH. Тем не менее, присутствие галогенов, особенно в кислотных элюентах, приводит к коррозии этого материала. Кроме того, его не следует использовать в ионообменных системах.

ИЗБЕГАЙТЕ: Уксусной кислоты, конц.
Сульфата аммония, вод.>3%
Хлоридов, вод., конц.
Хлоруксусной кислоты
Щавелевой кислоты, конц.

Лимонной кислоты, конц.
Формальдегида, конц.
Соляной кислоты, конц
Азотной кислоты, конц
Гипохлорит натрия, >1%

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

ПИИК (PEEK)

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

ИЗБЕГАЙТЕ:

Хлорорганики, например, метиленхлорида
ДМСО

Концентрированных водных галогенсодержащих растворов
Фтороводородной кислоты, >3% вод.

Азотной кислоты, конц.

Серной кислоты, конц.

ТГФ

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

Стекло (Glass)

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

ИЗБЕГАЙТЕ: Соляной кислоты, конц.
Азотной кислоты, конц.
Гидроксида натрия, конц.

12. Приложение 2.

1 **МЕМБРАННЫЕ ФИЛЬТРЫ**

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

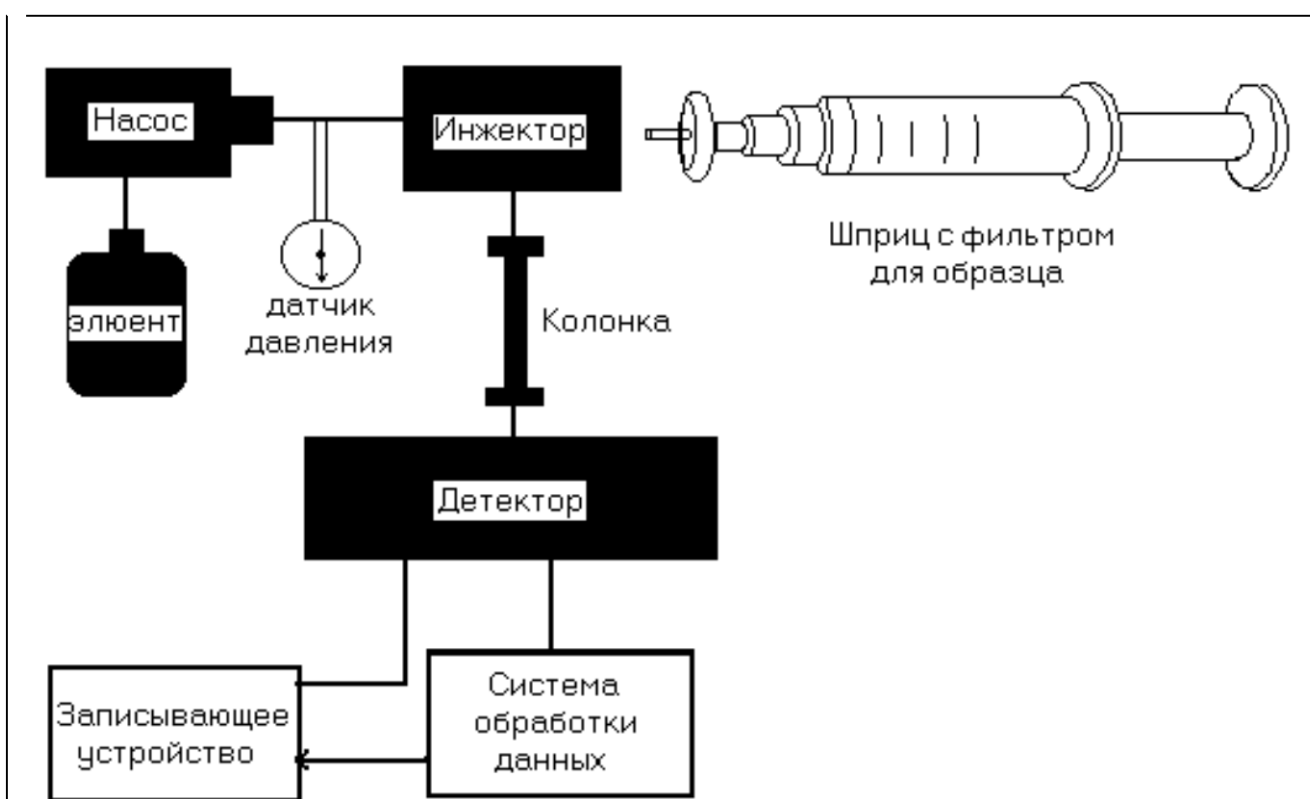


Рисунок 12. Выделенные чёрным цветом компоненты ВЭЖХ системы могут быть выведены из строя механическими примесями.

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

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

Обычно хроматографисты используют для удаления механических примесей фильтры с диаметром пор от 1,0 до 0.45мкм. Однако существуют фильтры с диаметром пор 0.2мкм, которые одновременно с удалением механических примесей проявляют стерилизующее действие. Фильтрация на таком уровне называется микрофильтрацией.

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

ХИМИЧЕСКАЯ СОВМЕСТИМОСТЬ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ.

Растворитель	Нейлон	ПТФЭ	ПВДФ	ПС	АЦ	РЦ	НЦ	ТАЦ	ПП
Кислоты Уксусная, ледяная	ОС	С	С	С	НС	С	НС	НС	С
Уксусная, 25%	С	С	С	С	С	С	С	С	С
Соляная, конц.	НС	С	С	С	НС	НС	НС	НС	С
Соляная, 25%	НС	С	С	С	НС	НС	ОС	НС	С
Серная, конц.	НС	С	НС	НС	НС	НС	НС	НС	С
Серная, 25%	НС	С	С	С	НС	ОС	С	НС	С
Азотная, конц.	НС	С	С	НС	НС	НС	НС	НС	С
Азотная, 25%	НС	С	С	С	НС	НС	ОС	НС	С
Фосфорная, 25%	НС	С	НД	НД	С	ОС	ОС	С	С
Муравьиная 25%	НС	С	НД	НД	ОС	С	С	ОС	С
ТХА, 10%	НС	С	НД	НД	С	С	С	С	С
Щёлочи NH ₄ OH, 25%	С	С	ОС	С	С	ОС	С	С	С
3N NaOH	С	С	С	С	НС	ОС	НС	НС	С
Спирты Метанол, 98%	С	С	С	С	С	С	ОС	С	С
Этанол, 98%	С	С	С	С	С	С	ОС	С	С
Этанол, 70%	ОС	С	С	С	ОС	С	ОС	ОС	С
изо- пропанол н-пропанол	С	С	С	С	С	С	ОС	С	С
Амиловый спирт, Бутанол	С	С	С	С	С	С	С	С	С
Бензиловый Спирт	С	С	С	НД	ОС	С	ОС	ОС	С
Этилен- гликоль	С	С	С	С	С	С	ОС	С	С
Пропилен- гликоль	С	С	С	С	ОС	С	НС	ОС	С
Глицерин	С	С	С	С	С	С	С	С	С
Углеводоро- ды Гексан, Ксилол	С	С	С	НС	С	С	С	С	НС
Толуол, Бензол	С	С	С	НС	С	С	С	С	НС
Керосин, Газолин	С	С	С	ОС	С	С	С	С	ОС

Тетралин, Декалин	НД	С	С	НД	С	С	С	С	НД
Галогени- рованные углеводо- роды Метилен- хлорид	ОС	С	С	НС	НС	С	С	НС	ОС
Хлороформ	С	С	С	НС	НС	С	С	НС	ОС
Трихлорэти- лен	С	С	С	НС	С	С	С	С	ОС
Хлорбензол Фреон	С	С	С	ОС	С	С	С	С	С
Тетрахлор- углерод	С	С	С	НС	ОС	С	С	ОС	ОС
Кетоны Ацетон, Цикло- гексанон	С	С	НС	НС	НС	С	НС	НС	С
Метилэтил- кетон	С	С	ОС	НС	ОС	С	ОС	ОС	ОС
Изопропил- ацетон	С	С	НС	НС	С	С	ОС	С	НД
Метилизо- бутилкетон	НД	С	ОС	НС	НД	С	НД	НД	ОС
Сложные эфирь Этилацетат, Метилаце- тат	С	С	С	НС	НС	С	НС	НС	ОС
Амил, Пропил, и Бутилацетат	С	С	НД	НС	ОС	С	НС	ОС	ОС
Пропилен- гликоль- ацетат	НД	С	НД	НС	НС	С	НС	НС	С
2-Этокси- этилацетат	НД	С	НД	НС	ОС	С	НС	ОС	НД
Метилцелло- зольацетат	НД	С	НД	НС	НС	С	НС	НС	С
Бензилбен- зоат	С	С	НД	НС	С	С	С	С	НД
Изопропил- миристат	С	С	НД	НС	С	С	ОС	С	НД
Трикрезил- фосфат	НД	С	НД	НС	С	С	ОС	С	НД
Оксиды- простые эфирь Этиловый эфир	С	С	С	С	С	С	НС	С	ОС
Диоксан, ТГФ	С	С	ОС	НС	НС	С	НС	НС	С
ДМСО	С	С	НС	НС	НС	С	НС	НС	С
Изопропило- -вый эфир	НД	С	С	С	С	С	НД	С	С

Азотсодержащие растворители Диметилформамид	ОС	С	НС	НС	НС	ОС	НС	НС	С
Диэтил-ацетамид	С	С	НД	НД	НС	С	НС	НС	НД
Триэтанол-амин	С	С	НД	НД	С	С	С	С	НД
Анилин	НД	С	НД	НД	НС	С	ОС	НС	НД
Пиридин	С	С	С	НС	НС	С	НС	НС	ОС
Разные Фенол, вод., 10%	НД	С	ОС	НС	НС	НС	НС	НС	С
Формальдегид, 30%	С	С	С	С	С	ОС	С	С	С
Пероксид водорода, 30%	С	С	НД	НД	С	С	С	С	НД
Силиконовое и минеральное масла	НД	С	С	С	С	С	С	С	С

Условные обозначения

С = совместим

ОС = ограниченно совместим (мембрана набухает и сморщивается)

НС = несовместим

НД = нет данных

ПТФЭ = Тефлон

ПВДФ = Поливинилидендифторид

ПС = Полисульфон

АЦ = Ацетат целлюлозы

РЦ = Регенерированная целлюлоза

НЦ = Нитрат целлюлозы

ТАЦ = Триацетат целлюлозы (исключение по молекулярному весу)

ПП = Полипропилен

2 СОВМЕСТИМОСТЬ МАТЕРИАЛОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

МАТЕРИАЛ	СОВМЕСТИМОСТЬ
Ацетат целлюлозы	АЦ. Используется в производстве мембранных фильтров. Подходит только для водных растворов. Растворим в полярных органических растворителях. Проявляет слабую способность удерживать белки.
Делрин®	Используется в фитингах и компонентах насоса. Не может быть использован с сильными кислотами, основаниями или окислительными агентами.
Кел - Ф®	Применяется в ферулах и уплотнениях. Не рекомендуется использовать в присутствии ТГФ или четырёххлористого углерода.
Нитроцеллюлоза	НЦ. Используется в мембранных фильтрах. Подходит только для водных растворов. Обладает высокой способностью удерживать белки.
Нейлон 66®	Используется в мембранных фильтрах. Подходит для водных растворов. Мембраны из Нейлона очень гидрофильны и мало экстрактивны.
ПИИК®	Полиэфирэфиркетон. Применяется как материал для компонентов насоса, фитингов и коммуникаций. Не рекомендуется использовать с ТГФ, метилхлоридом, ДМСО или сильными кислотами/основаниями. Обладает высокой механической прочностью.
Полипропилен	ПП. Используется в компонентах низкого давления. Не рекомендуется использовать с органическими растворителями. Мало экстрактивен.
Полисульфон	ПС. Используется в мембранных фильтрах. Не рекомендуется использовать с органическими растворителями. Мембрана, выполненная из полисульфона гидрофильна и не склонна к связыванию белков.
Поливинилхлорид	ПВХ. Используется в мембранных фильтрах. Не рекомендуется использовать с органическими растворителями.
Поливинилиден-дифторид	ПВДФ, KYNAR®. Используется в мембранных фильтрах. Годится как для водных, так и неводных растворов. Гидрофилен, проявляет слабую способность удерживать белки.
Нержавеющая сталь	SS316 (для ВЭЖХ) водные растворы галогенированных солей вызывают коррозию. Перед использованием должна быть пассивирована 1% азотной кислоты.
Тефлон®	ПТФЭ. Инертен по отношению ко всем растворителям, кислотам и основаниям, используемым в ВЭЖХ. Используется на стороне низкого давления. Обладает ярко выраженной гидрофобностью.
Тэфзел®	ЭТФЭ. Схож по свойствам с Тефлоном, но не рекомендуется к использованию с хлорированными растворителями выдерживает более высокие давления.
Сплав Титана	(TiO₂) x Используется как материал для компонентов насоса. Коррозионно устойчив.