

# От переводчиков

---

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) принадлежит к числу наиболее распространенных современных методов аналитической химии. Благодаря разнообразию используемых сорбентов и подвижных фаз метод нашел применение в разнообразных областях анализа, включая определение биологически активных веществ и лекарственных препаратов. Следует отметить, что успешное разделение и определение сложных смесей органических соединений возможно лишь при надлежащем выборе состава подвижной фазы.

Книга известного американского специалиста П. Садека, руководителя химической группы компании Access Business Group (крупный производитель пищевых добавок, косметики и продуктов бытовой химии, Ада, Мичиган), президента Аналитической консультативной лаборатории (производственно-исследовательская консалтинговая фирма, Кентвуд, Мичиган), представляет собой уникальное сочетание справочного пособия и теоретического руководства применения растворителей в ВЭЖХ. Она является одним из самых современных зарубежных изданий по ВЭЖХ, рассматривающим использование различных растворителей и их смесей в качестве подвижных фаз. Практически ни одна другая книга не была посвящена этой важной хроматографической проблеме. Богатый фактический материал иллюстрирует теоретические предпосылки, изложенные в первых главах, и служит прекрасной основой для разработки новых методов разделения.

На английском языке книга вышла вторым изданием. Следует отметить огромную работу автора по актуализации цитируемой литературы. По сравнению с первым изданием, содержащим 1123 ссылки (большинство которых во втором издании обновлено), настоящая монография содержит ссылки более чем на 1600 работ. При обсуждении автор не ограничивается сухой констатацией полученных результатов, а осмысливает их критически и дает, где это необходимо, методические рекомендации, основанные на теоретических посылах. Поэтому книга поможет сберечь немало времени и сил тем исследователям, которые разрабатывают новые хроматографические методы. Помимо результатов оригинальных работ, книга содержит немало полезных справочных данных, которые организованы очень удачно. Вообще следует высоко оценить структуру книги: каждый класс растворителей рассмотрен в отдельной главе, которая в свою очередь делится на разделы, соответствующие типовой принадлежности определя-

емых веществ. Большое внимание уделено таким современным приложениям ВЭЖХ, как определение биологически активных и лекарственных соединений. Книга отличается исключительной четкостью изложения материала, безукоризненностью методического подхода. Приведенное в книге большое число структурных формул определяемых соединений очень удачно дополняет текст, делая его более наглядным.

Книга представляет несомненный интерес для всех специалистов в области ВЭЖХ, фармацевтической и биохимической промышленности, для работников аналитических лабораторий (особенно тех, кто использует в своей практике жидкостную хроматографию), для преподавателей вузов и студентов.

Перевод выполнен канд. хим. наук А. А. Горбатенко (гл. 1–3, разд. 4.4–4.7, гл. 10) и Е. И. Ревиной (разд. 4.1–4.3, гл. 5–9).

*А. Горбатенко  
Е. Ревина*

# Предисловие

---

Разделение методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) представляет собой основной инструмент для многочисленных аналитических лабораторий. В последние годы ВЭЖХ получила развитие в двух важных направлениях. Во-первых, она стала доминирующим методом в таких областях, как фармацевтика, нутрацевтика (производство продуктов для оздоровительного питания из природных источников) и идентификация белков и пептидов. Во-вторых, наряду с этим, более широкое распространение в качестве метода детектирования получила масс-спектрометрия.

Второе издание было переработано с учетом этих изменений. 1123 первоначальные ссылки были заменены там, где это возможно, на более новые, а общее количество ссылок увеличилось до 1613. Глава 1 была разделена на три новые главы, первая из которых по-прежнему посвящена свойствам растворителей, вторая — в некоторой степени расширяет тему оптимизации метода, а третья — кратко описывает аттестацию метода/системы и рабочие параметры.

Наиболее разительным изменением является добавление химических структур. Это было сделано с целью дать аналитику быструю справку об упомянутых химических веществах и их сходстве или различии. Вполне понятно, что представить структуры всех соединений невозможно (да и не нужно). Например, простые замещенные бензолы, обычные кислоты типа уксусной, бензойной и т. п., а также простые структуры, такие как пентан или 1-пентанол, не приводятся.

Огромные старания были приложены для проверки этих структур, а также для проверки и перепроверки точности их изображения. Однако из-за колоссального размера базы данных и малочисленности доступных независимых источников для проверки структур (т. е. вторичных источников) ошибки все же могут иметь место.

Как и в случае первого издания, я надеюсь, что информация, содержащаяся в этой книге, существенно уменьшит затраты времени и труда аналитика на разработку конечных методов, а также поможет избежать многочисленных проблем на пути их реализации.

*Пол Садек*  
Гранд-Рапидс, Мичиган

# Введение

---

В этой книге растворители для ВЭЖХ рассматриваются в двух важных аспектах: 1) способность жидкости быть хорошим растворителем и 2) способность растворителя эффективно работать в хроматографической системе. Первые три главы содержат информацию, касающуюся растворителей и их классов, способов оптимизации метода, а также определения и использования протоколов аттестации метода и пригодности параметров хроматографической системы. Эти главы описывают растворители с точки зрения их практического использования.

В гл. 1 физические и химические свойства растворителей обсуждаются в плане их воздействия на хроматографическую систему. Четкое понимание влияния этих свойств сэкономит хроматографу немало времени и сил.

В главе по оптимизации метода (гл. 2) описываются пять методов, обычно используемых с целью оптимизации и разработки методик: методы элюотропных рядов и силы растворителя, триангуляции, пробного градиента, оконных диаграмм и «грубой силы». Чтобы облегчить использование этих понятий, приведены детальные примеры и объяснения. Теория *не* обсуждается.

Глава 3 посвящена вопросам аттестации (например, дает ли метод точные результаты [правильность], воспроизводимы ли они [воспроизводимость и ошибкоустойчивость] и повторяются ли от аналитика к аналитику и от лаборатории к лаборатории [повторяемость]), а также пригодности параметров рассматриваемой системы (например, тех переменных, которые контролируют и записывают, чтобы убедиться, что система функционирует правильно в течение любого цикла анализа). В целом, три первые главы включают в себе аспекты использования растворителей и хроматографических систем.

Последние семь глав (с четвертой по десятую) представляют собой документированные реальные примеры хроматографического использования отдельно для каждого класса растворителей: спирты, кетоны и сложные эфиры, нитрилы и азотсодержащие вещества, простые эфиры и т. д. Эти главы содержат детали конкретных примеров по разделению, что позволяет использовать эти сведения на практике напрямую или (с учетом указаний по оптимизации) для модификации уже существующих методов разделения с целью разработки новых специфических методов разделения.

# Обозначения

---

|                    |  |
|--------------------|--|
| ББА                | бомбардировка быстрыми атомами   |
| БГТ                | 2,6-ди- <i>трет</i> -бутил-4-метилфенол (бутилзамещенный гидрокситолуол) |
| ВЭЖХ               | высокоэффективная жидкостная хроматография                               |
| ГПХ                | гель-проникающая хроматография   |
| ДМСО               | диметилсульфоксид  |
| ДМФА               | диметилформамид  |
| ДСН                | додецилсульфат натрия  |
| ЖХ                 | жидкостная хроматография   |
| ИДРС               | испарительный детектор рассеяния света                                   |
| ИКФП               | ИК-спектроскопия с фурье-преобразованием                                 |
| ИПС                | изопропиловый спирт, 2-пропанол  |
| ИСП                | индуктивно-связанная плазма  |
| М                  | молярный, молярность (моль/л)  |
| мм                 | миллимолярный ( $10^{-3}$ моль/л)  |
| ммоль              | миллимоль ( $10^{-3}$ моль)  |
| мкМ                | микромолярный ( $10^{-6}$ моль/л)  |
| мкмоль             | микромоль ( $10^{-6}$ моль)  |
| нмоль              | наномоль ( $10^{-9}$ моль)   |
| пмоль              | пикомоль ( $10^{-12}$ моль)  |
| фмоль              | фемтомоль ( $10^{-15}$ моль)   |
| <i>M</i>           | молекулярная масса   |
| МБЭ                | метил- <i>трет</i> -бутиловый эфир                                       |
| мг                 | миллиграмм ( $10^{-3}$ г)  |
| мкг                | микрограмм ( $10^{-6}$ г)  |
| нг                 | нанограмм ( $10^{-9}$ г)   |
| пг                 | пикограмм ( $10^{-12}$ г)  |
| фг                 | фемтограмм ( $10^{-15}$ г)   |
| мл                 | миллилитр ( $10^{-3}$ л)   |
| мкл                | микролитр ( $10^{-6}$ л)   |
| млн <sup>-1</sup>  | миллионная часть   |
| млрд <sup>-1</sup> | миллиардная часть  |
| МПФ                | модификатор подвижной фазы   |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| МС                      | масс-спектрометрия   |
| НФ                      | нормальная фаза  |
| ОФ                      | обращенная фаза  |
| ОФА                     | <i>o</i> -фталевый альдегид  |
| ПАУ                     | полиароматический углеводород  |
| ПП                      | показатель преломления   |
| ПФ                      | подвижная фаза   |
| ТГФ                     | тетрагидрофуран  |
| ТФК                     | трифторуксусная кислота  |
| ТЭА                     | триэтанолламин   |
| УФ                      | ультрафиолетовый (свет)  |
| ФМХФ                    | 9-флуоренилметилхлорформат   |
| ХИАД                    | химическая ионизация при атмосферном давлении                                    |
| ЭДТА                    | этилендиаминтетрауксусная кислота  |
| ЭХ                      | электрохимический  |
| C <sub>4</sub>          | привитая фаза с бутил-радикалами   |
| C <sub>8</sub>          | привитая фаза с октил-радикалами   |
| C <sub>18</sub>         | привитая фаза с октадецил-радикалами   |
| C <sub><i>n</i></sub>   | алкильная цепь из <i>n</i> атомов углерода                                       |
| CN                      | привитая фаза с цианопропил-радикалами   |
| <i>k'</i>               | коэффициент емкости [ $\equiv (t_R - t_0)/t_0$ ]                                 |
| <i>P'</i>               | параметр силы растворителя   |
| S/N                     | отношение сигнал/шум   |
| <i>t<sub>R</sub></i>    | время удерживания  |
| <i>t<sub>0</sub></i>    | мертвое время удерживания  |
| $\alpha$                | коэффициент селективности [ $\equiv (k'_1/k'_2)$ ]                               |
| $\varepsilon^\circ$     | элюирующая сила  |
| $\lambda$               | длина волны  |
| $\lambda_{\text{возб}}$ | длина волны возбуждения, используемая при флуоресцентном детектировании          |
| $\lambda_{\text{эм}}$   | длина волны испускания (эмиссии), используемая при флуоресцентном детектировании |

## Глава 1

# Физические и химические свойства растворителей

---

Когда хроматографист разрабатывает новый метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), значительная часть времени тратится на выбор колонки по ее эффективности. Это и не удивительно, поскольку на сегодняшний день рынок предлагает буквально сотни колонок. Большое число работ показывает, что неподвижная фаза играет ключевую роль в общем процессе удерживания [1–4] и выбор растворителя, которому обычно уделяют недостаточно внимания, оказывает огромное влияние на общее время удерживания, форму пика, специфичность функциональной группы, а также на важнейшие рабочие параметры системы, такие как уровни давления и фонового сигнала детектора [5–7].

Чтобы эффективно сравнивать растворители по их преимуществам или облегчить хроматографисту задачу выбора растворителя, следует иметь в виду три фундаментальных фактора: 1) физические свойства растворителя, 2) химические свойства растворителя (особенно те, которые связаны с его пригодностью для данной системы и аспектами безопасности) и 3) влияние этих свойств на хроматографический процесс (т. е. работу системы, хроматографическое разделение, пределы обнаружения и воспроизводимость результатов анализа). Эта глава посвящена химическим и физическим свойствам групп растворителей для ВЭЖХ, а также важным характеристикам, применимости и ограничениям отдельных растворителей.

Однако прежде всего важно определить два термина ВЭЖХ: *растворитель* и *подвижная фаза*. В этой книге термин «растворитель» используется всякий раз при рассмотрении химических и физических свойств чистых жидкостей и их смесей, тогда как термин «подвижная фаза» — для того, чтобы подчеркнуть использование в хроматографической системе. Когда речь идет о подготовке растворителей перед применением в системе, используют оба термина.

### 1.1. УФ граница прозрачности

Сама по себе УФ граница прозрачности обычно не является тем критическим параметром, на котором основан выбор растворителя. Скорее, УФ граница прозрачности представляет собой быстрый способ оценки того, насколько характеристики растворителя 1) делают его пригодным с учетом рабочей длины волны системы

и 2) меняются от одной партии к другой. Большинство производителей приводят эти данные для каждой партии растворителя на этикетках, прикрепленных к каждой емкости с растворителем, поскольку определить эти данные просто.

Чтобы удостовериться, что значение УФ границы прозрачности интерпретировано правильно, ее рабочее определение таково: «Длина волны, при которой оптическая плотность растворителя в 1-см кювете (при использовании в качестве канала сравнения воздуха) равна единице». Математическая связь между оптической плотностью, интенсивностями падающего и прошедшего лучей при определенной длине волны выражается законом Бера в виде:

$$\lg\left(\frac{1}{T}\right) = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = A = \varepsilon bc \quad (1.1)$$

где  $T$  — пропускание,  $I_0$  — интенсивность падающего луча,  $I$  — интенсивность прошедшего луча,  $A$  — оптическая плотность,  $\varepsilon$  — молярный коэффициент поглощения, л/(моль · см),  $b$  — длина кюветы (см),  $c$  — концентрация вещества в растворе (моль/л).

Детальное рассмотрение уравнения 1.1 приводит к открытию неточности: УФ излучение не поглощается полностью при  $A = 1$  (т. е.  $T \neq 0$  при  $A = 1$ ), а, скорее, значительно ослабляется. В результате величина УФ границы прозрачности, определенная выше, имеет место, когда интенсивность прошедшего луча, достигающего детектора, ослаблена до уровня 10% от интенсивности излучения, падающего на пробу.

Если в растворителе имеются примеси, общая оптическая плотность при данной длине волны  $\lambda$  представляет собой сумму вкладов каждого компонента:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)_{\text{растворитель}} bc_{\text{растворитель}} + \varepsilon(\lambda)_{\text{примесь } a} bc_{\text{примесь } a} + \dots + \varepsilon(\lambda)_{\text{примесь } n} bc_{\text{примесь } n} \quad (1.2)$$

Следовательно, для любой  $\lambda$  небольшие концентрации примесей с большими значениями  $\varepsilon$  или высокие концентрации примесей с низкими значениями  $\varepsilon$  будут создавать проблемы с оптической плотностью. Тщательное удаление таких примесей из растворителей, таким образом, является критическим для получения воспроизводимых хроматографических и аналитических результатов.

В табл. 1.1 приведены диапазоны границ прозрачности для классов растворителей (например, класс предельных спиртов включает метанол, *n*-пропанол, изопропанол и т. д.). В целом, растворитель с УФ границей прозрачности большей, чем используемая в анализе рабочая длина волны, дает высокую фоновую оптическую плотность, что исключает его из дальнейшего рассмотрения. Например, высокий объемный процент спирта в подвижной фазе не рекомендуется использовать при  $\lambda < 220$  нм, и, конечно, он совершенно недопустим при  $\lambda < 205$  нм.



Таблица 1.1. Примерные диапазоны УФ границ прозрачности для разных классов растворителей

| Растворитель или класс растворителей <sup>a</sup>                            | Граница прозрачности, нм |
|--|--------------------------|
| Ацетонитрил и вода   | <190                     |
| Алканы (гексан, изооктан и т. д.)  | 190–205                  |
| Предельные спирты (метанол, изопропанол и т. д.)                             | 205–220                  |
| Предельные простые эфиры (диэтиловый, метил- <i>трет</i> -бутиловый и т. д.) | 210–220                  |
| Алкилхлориды (дихлорметан, хлороформ и т. д.)                                | 220–270                  |
| Фреоны   | 225–245                  |
| Алкилацетаты (этил- и бутилацетат и т. д.)                                   | 250–260                  |
| Алкиламида (диметилформамид, диметилацетамид и т. д.)                        | 260–270                  |
| Бензол и алкилбензолы (толуол, ксилол и т. д.)                               | 270–290                  |
| Хлорбензолы (хлорбензол, 1,2-дихлорбензол и т. д.)                           | 280–310                  |
| Алкилкетоны (ацетон, метилпропилкетон и т. д.)                               | 320–340                  |

<sup>a</sup> Все растворители без стабилизаторов.

Исключение составляет случай, когда растворитель используют как дополнительный компонент подвижной фазы, например, в количестве 10 об. % или менее. В таких случаях работа в области УФ границы прозрачности для 10% этого компонента приводит к фоновой оптической плотности, равной лишь 0,1. Часто это является допустимым, несмотря на увеличение уровня шумов (что приводит к более высоким пределам обнаружения), уменьшение линейного динамического диапазона и снижение чувствительности.

Однако использование величины УФ границы прозрачности в качестве единственного критерия выбора растворителя может привести к тому, что возможность эффективного разделения будет упущена, что обсуждается в следующих разделах.

## 1.2. Зависимость оптической плотности от длины волны

Большую практическую ценность представляет зависимость оптической плотности растворителя от длины волны (спектр поглощения). На рис. 1.1 показаны спектры, полученные в 1-см кювете для типичных растворителей, применяемых в качестве обращенной фазы (ОФ), — метанола, ТГФ (тетрагидрофурана, нестабилизированного, или спектрально чистого) и ацетонитрила. На рис. 1.2 приведены типичные спектры растворителей, используемых в качестве нормальной фазы (НФ), — гексана, этилацетата и дихлорметана (метиленхлорида). Важно понять, что не все спектры растворителей изящно представлены экспоненциальными или модифицированными гауссовыми кривыми. Детальное обсуждение спектров отдельных растворителей с точки зрения перспективных ОФ или НФ разделений

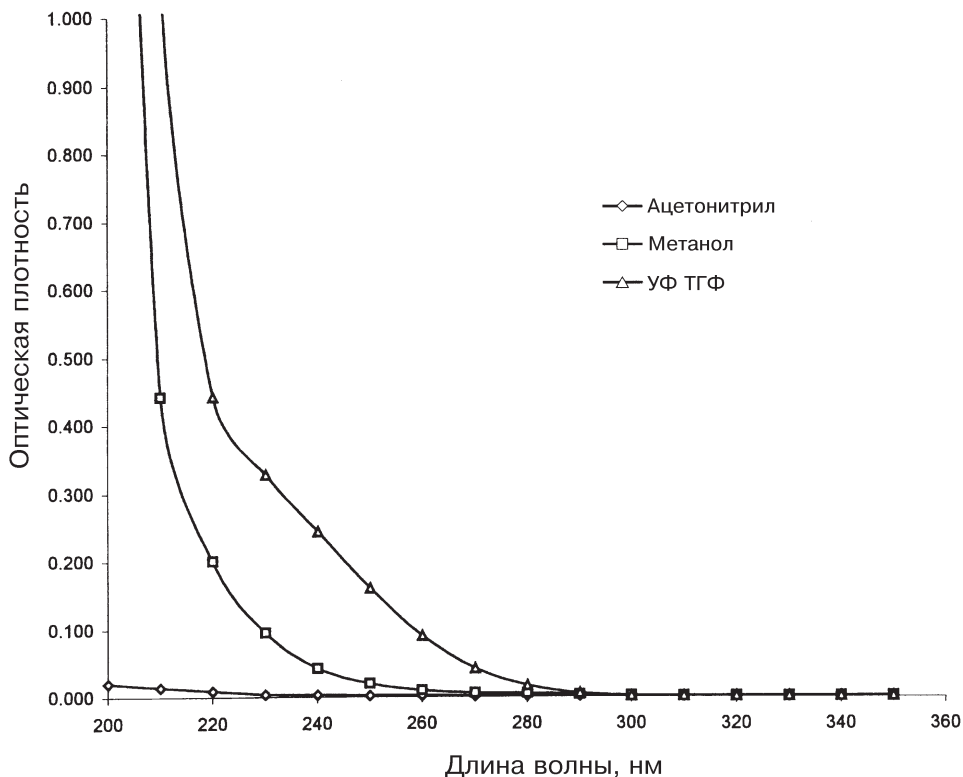


Рис. 1.1. Типичные кривые оптическая плотность — длина волны для часто используемых обращенно-фазовых растворителей: ацетонитрила, метанола и тетрагидрофурана (ТГФ) без стабилизатора. Отметим, что хотя УФ граница прозрачности ТГФ и метанола различается всего на 7 нм, оптическая плотность метанола составляет всего 0,37 при УФ границе прозрачности ТГФ, равной 212 нм.

позволит показать тонкости, ограничения и преимущества, связанные с использованием разнообразных растворителей.

По определению, *обращенно-фазовая колонка имеет неполярную поверхность или привитую фазу*. Примерами таких фаз служат фазы с привитыми октадецил- ( $C_{18}$ ), октил- ( $C_8$ ) и фенил-радикалами. (Заметим, что в действительности связующим звеном обычно является диметилалкилсилан; колонка  $C_{18}$  может быть корректно описана как содержащая фазу с привитым диметиллоктадецилсиланом.) Растворители, используемые в сочетании с ОФ колонками, называют обращенно-фазовыми растворителями. Большая часть ОФ растворителей представляет собой смеси воды с водорастворимыми растворителями, такими как ацетонитрил, метанол и тетрагидрофуран. В отдельных случаях в обращенно-фазовых разделениях используют неводные растворители. Такие способы разделения носят название *неводные обращенно-фазовые (НВОФ)*. Примером подвижной фазы в НВОФ разделениях может служить смесь метанола с ацетонитрилом в объемном отношении 50:50.

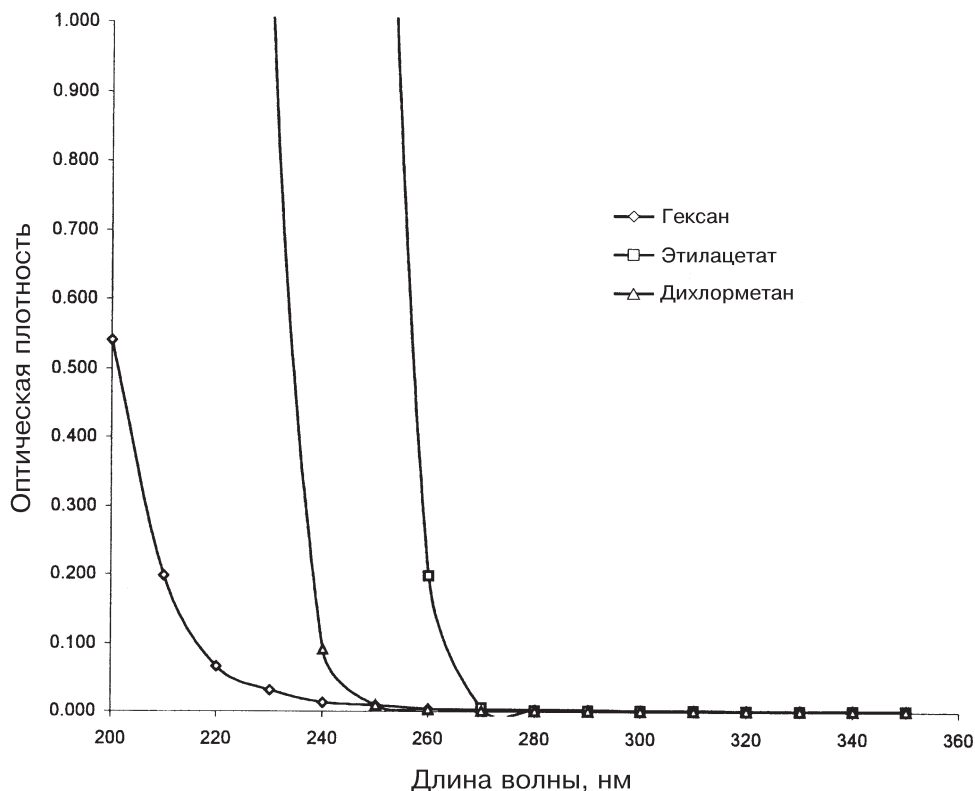


Рис. 1.2. Типичные кривые оптическая плотность — длина волны для часто используемых нормально-фазовых растворителей: гексана, этилацетата и дихлорметана.

Напротив, *нормально-фазовые колонки имеют полярную поверхность* или привитую фазу, такую как кремнезем с аминопропил- или цианопропил-радикалами (часто присоединенными к этоксисилану), и используют неполярные растворители, например гексан, изооктан и циклогексан. Эти растворители с очень небольшими добавками полярных этилацетата, дихлорметана или диэтилового эфира применяют в качестве подвижных фаз. Примером нормально-фазовой подвижной фазы является смесь гексана с этилацетатом в объемном отношении 99,5:0,5. При использовании кварцевых колонок для нормально-фазовых разделений обычно избегают присутствия в растворителе воды, поскольку она эффективно дезактивирует этот носитель.

Наконец, существует ряд гибридных методов разделения, в которых нормально-фазовую колонку (цианопропил, диол, аминопропил и т. д.) применяют в сочетании с обращенно-фазовой смесью растворителей. Так поступают, потому что эти фазы гидрофильны и обеспечивают необходимый диапазон полярностей для использования в сочетании с ОФ растворителями.

[ . . . ]