УДК 543/545

МЕТРОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ БАЗ ДАННЫХ ВЭЖХ-УФ. ИССЛЕДОВАНИЕ И ВЫБОР ВЕЩЕСТВ-МАРКЕРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СВОБОДНОГО ОБЪЕМА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ

© Г. И. Барам[1], И. Н. Азарова[1], Е. В. Кулябина[2], О. Л. Рутенберг[2]

Статья поступила 10 июля 2009 г.

Исследована возможность применения ряда неорганических солей: KBr, KI, $KN0_3$ и KSCN в качестве веществ-маркеров свободного объема *(V_0)* обращенно-фазовой колонки в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием для контроля этого параметра при использовании баз данных ВЭЖХ-УФ. Найдено, что наиболее подходящим маркером является йодид-анион, позволяющий получить более точное значение V_0 и обладающий значительным оптическим поглощением в диапазоне длин волн 210 - 250 нм.

Ключевые слова: химический анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, базы данных ВЭЖХ-УФ.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) — один из важнейших методов современной аналитической химии. В сочетании с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра (УФ-детектированием) этот метод широко применяется в лабораториях разного профиля — научных, экспертных, промышленных. Обязательным условием проведения анализа методом ВЭЖХ является наличие стандартных образцов определяемых веществ, по которым осуществляется градуировка хроматографа. Общая проблема многих лабораторий состоит, с одной стороны, в труднодоступности этих образцов, а с другой (при наличии таких образцов) — в необходимости контроля их состояния при хранении. Еще одно неудобство «классического» варианта ВЭЖХ-анализа связано с необходимостью периодической градуировки хроматографа по каждому из определяемых веществ, особенно при замене колонки и элюентов. Это приводит к тому, что в обычной практике ВЭЖХ, когда для определения каждого вещества (группы веществ) используются конкретные условия (хроматографическая колонка, элюенты и т. д.), требуется много времени и расходуемых материалов при переходе от одного анализа к другому.

Для решения этих проблем в последнее время создаются «универсальные» хроматографические методы с применением баз данных ВЭЖХ-УФ. Базы данных (БД) содержат градуировочные хроматографические параметры многих сотен веществ, а также спектральные параметры этих соединений, необходимые для их надежной идентификации [1 – 8]. Такой подход освобождает от необходимости каждый раз градуировать хроматограф перед проведением анализа, но он возможен лишь при строгом контроле правильности и воспроизводимости хроматографических и спектральных параметров прибора, а «перенос» базы данных на аналогичные хроматографы требует подтверждения показателей воспроизводимости, установленных для методики выполнения измерений с использованием этой БД.

В работах [9, 10] описан метод ВЭЖХ-анализа для измерения массовой доли УФ-поглощающих веществ в растворе с использованием их хроматографических параметров (объемов удерживания, удельных площадей пиков) и идентификации пиков этих веществ на хроматограмме по их спектральным параметрам (спектральным отношениям). Включенные в базу данных перечисленные параметры получены на хроматографах «Милихром А-02» (ЗАО «Институт хроматографии «ЭкоНова», г. Новосибирск) при соблюдении следующих условий:

колонка диам. 2 × 75 мм с обращенно-фазовым сорбентом ProntoSIL 120 – 5 C18 AQ;

элюенты:

в насосе «А» — [4M $LiClO_4$ и 0,1M $HClO_4$] : H_2O = = (5 : 95);

в насосе «Б» — ацетонитрил;

расход подвижной фазы 100 мм^3/мин;

градиент: от 5 до 100 % «Б» за 40 мин; 100 % «Б» за 3 мин;

температура термостата колонки 40 °С;

длина волны детектора λ 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм «одновременно»;

объем вводимой пробы 4 мм^3.

Для контроля значимых параметров ВЭЖХ-системы разработана и метрологически аттестована хроматографическая процедура с использованием пятикомпонентной аттестованной смеси (бромид калия, уридин,

[1] ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия; e-mail: baram@econova.nsk.su

[2] ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы», Москва, Россия.

кофеин, мета- и ортонитроанилины; растворитель: 2 % ацетонитрила в воде). Каждый компонент этой смеси предназначен для проверки определенного параметра (параметров) хроматографа — от объема колонки до характеристик детектора [9]. Если экспериментальные значения всех контролируемых параметров соответствуют своим аттестованным значениям в установленных пределах, то тестируемый хроматограф признается пригодным для проведения анализов с использованием БД. Анализ сводится к хроматографированию исследуемого образца в тех же условиях. Затем проводят предварительную идентификацию анализируемых компонентов по объемам удерживания и окончательную — по спектральным отношениям хроматографических пиков. В случае положительной идентификации проводится количественное определение.

Использование абсолютного значения объема удерживания вещества для предварительного поиска соответствий в БД предполагает постоянство (с известными допусками) размеров применяемых хроматографических колонок, важнейшей характеристикой которых является свободный объем (V_0). По определению работ [11, 12], V_0 — часть объема колонки, не занятая сорбентом. В процессе хроматографии V_0 соответствует объему подвижной фазы в колонке. Знание величины V_0 необходимо не только для сопоставления хроматограмм, полученных на формально «одинаковых» колонках, но и для расчета хроматографических характеристик веществ (например, факторов емкости), а также для масштабирования хроматографических процессов. Для измерения V_0 предложен ряд как весовых, так и хроматографических методов [13].

Теоретически свободному объему колонки соответствует «объем удерживания» неудерживаемого вещества. Например, в качестве неудерживаемого вещества в «Стандартном образце 870» Национального института стандартов и технологии США (SRM 870, NIST USA) применяется урацил, который не удерживается на обращенных фазах при содержании в элюенте 80 % метанола. При меньшем содержании в элюенте органического растворителя урацил заметно удерживается и для определения значения V_0 использован быть не может. Авторы вышеописанного метода [9, 10] для хроматографического контроля величины V_0 в качестве вещества-маркера применяли бромид-анион, исходя из предположения, что он не удерживается колонкой в указанных выше хроматографических условиях. Однако это предположение требует доказательства.

Целью данной работы являлись исследование обоснованности выбора бромид-аниона в качестве маркера V_0 для колонки с обращенно-фазовым сорбентом, а также изучение возможности применения других веществ-макеров.

В работе использовали жидкостный хроматограф «Милихром А-02» с колонкой диам. 2 × 75 мм, заполненной объемно-пористым обращенно-фазовым сорбентом ProntoSIL 120-5 C18 AQ («Bischoff Analysentechnik und Geräte GmbH», Германия).

Для хроматографического определения значения V_0 в колонку вводили водные растворы солей KBr, KI, KNO_3 и KSCN (квалификация хч) с концентрацией 1,0 мг/см^3, регистрируя пики гидрофильных УФ-поглощающих анионов. Условия хроматографии: элюент «А» — вода или раствор [4М $LiClO_4$ и 0,1М $HClO_4$] : H_2O = (5 : 95); элюент «Б» — ацетонитрил для ВЭЖХ (НПК «Криохром», г. Санкт-Петербург); скорость потока 100 мм^3/мин, температура колонки 40 °С, объем пробы 2 мм^3. Измерение объема сжимаемости подвижной фазы, находящейся во всей хроматографической системе, за исключением колонки (определение поправки на сжатие для получения действительного значения V_0), проводили, заменяя колонку коротким фторопластовым капилляром. Капилляр герметично пережимали. Включали насос, заполненный ацетонитрилом или водой, и при достижении заданного давления в диапазоне от 1 до 7 МПа останавливали поток. Капилляр опускали в предварительно взвешенную пробирку, разжимали зажим и собирали выдавленную жидкость. Объем собранной жидкости, соответствующий объему сжатия, находили по разности масс пустой пробирки и пробирки с жидкостью с учетом ее плотности.

Для определения V_0 весовым методом колонку, заполненную ацетонитрилом, взвешивали, затем высушивали в шкафу при 80 °С до постоянной массы в течение 12 – 14 ч.

При пикнометрическом измерении свободного объема колонку поочередно заполняли ацетонитрилом и водой и взвешивали. Значение V_0 вычисляли по формуле МакКормика и Каргера [13]:

$$V_0 = (W_x - W_y)/(\rho_x - \rho_y), \qquad (1)$$

где W — масса колонки, заполненной растворителем x или y; ρ — плотность растворителя.

На практике в ВЭЖХ применяют следующие методы измерения свободного объема колонки:

1. Пикнометрический метод предполагает поочередное взвешивание колонки, заполненной растворителями с разными плотностями. Расчет V_0 проводят по уравнению (1). Этот метод трудоемок и неудобен для частого применения; обычно его используют для сравнения с результатами, полученными другими методами.

2. Весовой метод заключается в измерении массы подвижной фазы, находящейся в колонке, с последующим расчетом ее объема. Массу подвижной фазы находят по разности масс колонки, заполненной растворителем, и колонки, высушенной до постоянной массы. Очевидно, что для адсорбентов, которые не допускают высушивания, этот метод неприменим.

3. Хроматографический метод состоит в измерении «объема удерживания» неудерживаемых (несор-

бирующихся) веществ. В качестве таких веществ-маркеров в обращенно-фазовой хроматографии с УФ-детектированием, когда элюент содержит мало органического растворителя или не содержит его, применяют гидрофильные вещества, как нейтральные (тиомочевину, ацетон, формамид и др.), так и ионогенные (неорганические и органические соли).

При использовании хроматографического метода измерения V_0 необходимо учитывать следующие особенности:

а) в хроматографическом эксперименте измеряется не свободный объем колонки, а «мертвый» объем (объем подвижной фазы между точкой ввода пробы и точкой ее обнаружения [11]), который включает в себя свободный объем колонки, объемы устройства ввода пробы и детектора, а также объемы коммуникаций между ними. В хроматографах «Милихром А-02» эти экстраколоночные объемы, согласно технической документации, составляют 3,8 ± 0,4 мм^3;

б) для колонок, заполненных сорбентами пористой структуры, полученное таким методом значение V_0 является правильным лишь в случае, когда молекулы вещества-маркера могут свободно проникать в поры неподвижной фазы и, таким образом, не исключаются сорбентом;

в) при хроматографировании вещества практически всегда измеряется не его объем удерживания (V_R), а его время удерживания (T_R). Значение V_R вычисляют как $V_R = FT_R$, где F — объемная скорость потока (расход) подвижной фазы.

Хроматографический анализ на хроматографе «Милихром А-02» (это относится ко всем хроматографам серии «Милихром») осуществляется путем ввода пробы в колонку после остановки потока и сброса давления до атмосферного. После включения насосов, которые представляют собой шприцы, поршни в шприцах подают элюент с постоянной линейной скоростью, однако объемная скорость из-за сжимаемости подвижной фазы становится постоянной лишь тогда, когда давление на входе в колонку достигнет постоянной величины, определяемой гидродинамическим сопротивлением колонки. Эта особенность хроматографа «Милихром А-02», схема жидкостных коммуникаций которого показана на рис. 1, приводит к тому, что вычисляемые по хроматограмме объемы удерживания веществ ($V_R = FT_R$) оказываются завышенными на объем сжатия подвижной фазы при изменении давления от атмосферного до рабочего, соответствующего заданной скорости потока. Эффекты, связанные со сжимаемостью подвижной фазы в насосах шприцевого типа, рассмотрены в работе [14], а для хроматографов серии «Милихром» — в работах [15, 16].

В настоящем исследовании измерение значения V_0 проводили хроматографированием неудерживаемых веществ (этот метод удобен для рутинной практики), а также — для сравнения — весовым и пикнометрическим методами.

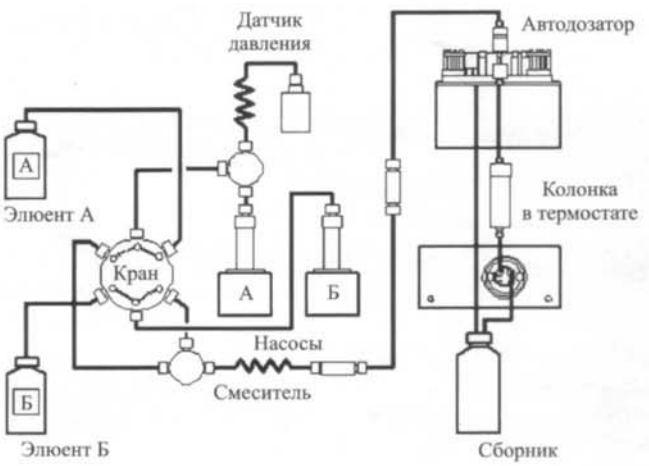

Рис. 1. Схема жидкостных коммуникаций хроматографа «Милихром А-02»

Действительный объем удерживания вещества ($V_{действ}$) рассчитывали по формуле $V_{действ} = V_{хром} - \Delta V$, где $V_{хром}$ — объем удерживания неудерживаемого вещества, полученный из хроматограммы, мм^3; ΔV — поправка на сжимаемость жидкости, мм^3, определяемая как $\Delta V = V_1 \beta_t \Delta p$, β_t — средний коэффициент сжимаемости жидкости, МПа$^{-1}$, который, в свою очередь, рассчитывается как

$$\beta_t = \frac{V_1 - V_2}{p_2 - p_1} \frac{1}{V_1},$$

где V_1 — объем жидкости при давлении p_1 и температуре t; V_2 — объем жидкости при давлении p_2 при той же температуре.

Методика измерения поправки на сжимаемость подвижной фазы в жидкостной системе хроматографа «Милихром А-02» приведена в экспериментальной части. Измерения проводили по пять раз при каждом значении давления. Используя коэффициенты сжимаемости ацетонитрила и воды [17] и считая объем сжимаемой жидкости, соответствующий внутреннему объему всей гидравлической системы хроматографа, равным 6 см^3, получили расчетные значения поправки на сжимаемость для используемых растворителей: ацетонитрила ($\Delta V^{расч}_{CH_3CN}$) и воды ($\Delta V^{расч}_{H_2O}$) (табл. 1).

Отклонение экспериментальных значений поправок от расчетных не превышает 13 % для воды и 7,4 %

Таблица 1. Экспериментальные и расчетные поправки на сжимаемость для воды и ацетонитрила

P, МПа	$\Delta V^{эксп}_{H_2O}$, мкл	$\Delta V^{расч}_{H_2O}$, мкл	$\Delta V^{эксп}_{CH_3CN}$, мкл	$\Delta V^{расч}_{CH_3CN}$, мкл
1	3,0	2,7	5,0	5,4
2	6,0	5,3	11,3	10,8
3	9,0	8,0	16,4	16,2
4	11,0	10,6	22,4	21,6
5	13,0	13,2	28,3	27,0
6	16,0	15,9	33,4	32,3
7	20,0	18,6	40,0	37,7

Таблица 2. Значения V_0 колонки диам. 2 × 75 мм с сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ, найденные разными методами

Анион	Хроматографический метод				Весовой метод			Пикнометрический метод		
	V_0, мкл		σ_r, %	σ_R, %	$V_0^{ср}$, мкл	σ_r, %	σ_R, %	$V_0^{ср}$, мкл	σ_r, %	σ_R, %
	$V_{хром}$	$V_{действ}$								
Бромид	144,4	133,1	0,05	0,5	155,3	0,6	3,7	142,7	1,5	6,2
Йодид	151,3	140,0	0,06	0,2						
Нитрат	146,9	135,6	0,15	0,2						
Роданид	165,7	154,4	0,30	0,4						

Примечание: $V_{хром}$ — значение V_0 без поправок; $V_{действ}$ — значение V_0 с учетом поправки на сжимаемость элюента и экстраколоночного объема; σ_r — относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости; σ_R — относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости.

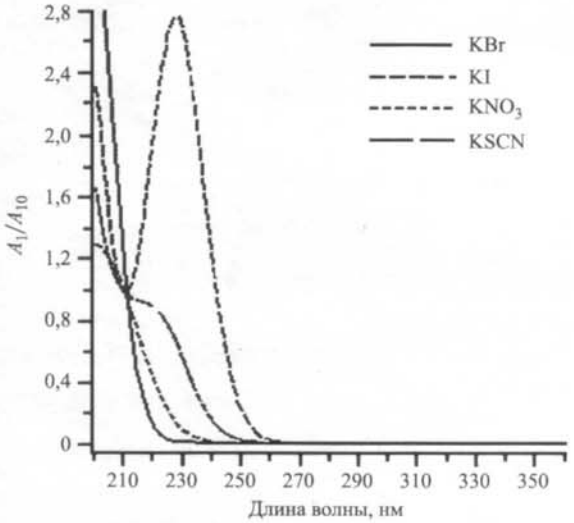

Рис. 2. Нормированные УФ-спектры водных растворов KBr, KI, KNO_3 и KSCN, записанные на детекторе хроматографа «Милихром А-02»

для ацетонитрила. Отклонения связаны, очевидно, с наличием упругих деформаций гидравлической системы хроматографа. Вклад этих отклонений невелик, и ими можно пренебречь.

Методы измерения свободного объема колонки, использованные в данной работе, описаны в экспериментальной части. Результаты с учетом поправки на сжатие подвижной фазы и поправки на величину экстраколоночного объема при хроматографическом определении приведены в табл. 2. Из табл. 2 следует, что наилучшее совпадение значений V_0, найденных хроматографическим методом, со значениями V_0, измеренными весовым и пикнометрическим методами, наблюдается для йодид- и роданид-анионов. Меньшие значения объемов удерживания бромид- и нитрат-анионов обусловлены, видимо, тем, что в выбранных нами хроматографических условиях бромид- и нитрат-анионы частично исключаются из неподвижной фазы, т. е. их гидратированные формы не проникают во все поры гидрофобного адсорбента. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты работ [18, 19], авторы которых утверждают, что удерживание нитрат-аниона зависит от его концентрации в образце, а иногда он регистрируется на хроматограмме в виде двойного пика.

При использовании УФ-спектрофотометрического детектора необходимо принимать во внимание еще один критерий выбора вещества-маркера свободного объема — величину его оптического поглощения. На рис. 2 показаны нормированные УФ-спектры водных растворов KBr, KI, KNO_3 и KSCN. По сравнению с роданид-анионом иодид-анион обладает заметно большим оптическим поглощением в области длин волн 210 – 250 нм. Это позволяет в несколько раз снизить его концентрацию в смеси для тестирования колонки по сравнению с концентрацией роданид-аниона. Таким образом, из числа исследованных веществ на роль хроматографического «маркера свободного объема» более всего подходит йодид-анион.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Jinno K., Hayashida M., Watanabe T.** Computer-Assisted Liquid Chromatography for Automated Qualitative and Quantitative Analysis of Toxic Drugs / J. Chromatogr. Sciences. 1990. Vol. 28. P. 367 – 373.
2. **Зенкевич И. Г.** Формирование базы данных по индексам удерживания лекарственных веществ в обращенно-фазовой ВЭЖХ / Журнал прикладной химии. 1994. Т. 67. № 11. С. 1877 – 1883.
3. **Koves E. M.** Use of HPLC-DAD in Forensic Toxicology / J. Chromatogr. A. 1995. Vol. 692. P. 103 – 119.
4. **Maier R. D., Bogusz M.** Identification Power of Standardized HPLC-DAD System for Systematic Toxicological Analysis / J. Analyt. Toxicology. 1995. Vol. 19. P. 79 – 83.
5. **Gaillard Y., Pepin G.** Use of HPLC with Photodiodearray UV Detection for the Creation of a 600 Compound Library. Application to Forensic Toxicology / J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 763. P. 149 – 163.
6. **Elliot S. P., Hale K. A.** Applications of an HPLC-DAD Drug-Screening System Based on Retention Indeces and UV Spectra / J. Analyt. Toxicology. 1998. Vol. 22. P. 279 – 282.
7. **Lambert W. E., Van Bocxlaer J. F., De Leenheer A. P.** Potential of HPLC-DAD in Forensic Toxicology / J. Chromatogr. B. 1997. Vol. 689. P. 45 – 53.
8. **Herzler M., Herre S., Pragst F.** Selectivity of Substance Identification by HPLC-DAD in Toxicological Analysis using a UV Spectra Library of 2682 Compounds / J. Analyt. Toxicology. 2003. Vol. 27. P. 233 – 242.
9. **Рутенберг О. Л., Фаткудинова Ш. Р., Барам Г. И., Азарова И. Н.** О метрологическом обеспечении баз данных для идентификации и количественного определения УФ-поглощающих веществ методом ВЭЖХ / Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2006. Т. 72. № 6. С. 59 – 64.

10. **Азарова И. Н., Барсегян С. С., Барам Г. И.** Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии: базы данных «ВЭЖХ-УФ» / В кн. «Хроматография на благо России»; под ред. А. А. Курганова. — М.: Граница, 2007. С. 653 – 665.
11. Хроматография. Основные понятия. Терминология / Под ред. В. А. Даванкова — М.: Сборники научно-нормативной терминологии. 1997. Вып. 114. С. 20.
12. **Каргер Б.** Связь теории и практики в высокоскоростной жидкостной хроматографии / В кн.: «Современное состояние жидкостной хроматографии»; под ред. Дж. Кирклендa. — М.: Мир, 1974. С. 14.
13. **Rimmer C. A., Simmons C. R., Dorsey J. G.** The measurement and meaninig of void volumes in reversed-phase liquid chromatography / J. Chromatogr. A. 2002. Vol. 965. P. 219 – 232.
14. **Martin M., Blu G., Eon C., Guiochon G.** The use of syringe-type pumps in liquid chromatography in order to achieve a constant flow-rate / J. Chromatogr. 1975. Vol. 112. P. 399 – 414.
15. **Baram G. I.** Portable liquid chromatograph for mobile laboratories. I. Aims. / J. Chromatogr. A. 1996. Vol. 728. P. 387 – 399.
16. **Барам Г. И.** Развитие метода микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии и его применение для исследования объектов окружающей среды / В кн.: «100 лет хроматографии»; под ред. Б. А. Руденко. — М.: Наука, 2003. С. 32 – 60.
17. Краткий справочник по химии. — Киев: Наукова думка, 1965. — 835 с.
18. **Daignault L. S., Jackman D. C., Rilemma D. P.** The Case of the Exlusive of t_m Values in HPLC / Chromatographia. 1989. Vol. 27. N. 2/3. P. 195 – 198.
19. **Daignault L. S., Jackman D. C., Rilemma D. P.** Behaviour of simple salts on silica and C18 columns. Retention dynamics of cations, anions and ion pairs / J. Chromatogr. 1989. Vol. 462. P. 71 – 84.