

Август

2005

α УМЧЕСКИЙ
НАУЗ

Редактор

К.С. Сычев

Рецензенты

Э.Л. Гоголашвили

Л.В. Сапрыкин

С.Н. Сычев

А.В. Удалов

Е.К. Федоров

Уширение пиков: "артефакты" или норма?

Сергей Н. Сычев¹⁾, Константин С. Сычев²⁾

1) ОрелГТУ, chemistry@ostu.ru

2) Найтек Инструментс, chromplus@list.ru, www.nytek.ru

В статье рассказывается об эксперименте по изучению уширения и расщепления пика бензойной кислоты при рН подвижной фазы порядка 5-6, то есть на 1-2 единицы больше рКа. Для объяснения результатов привлечена идея об образовании "промежуточных" достаточно устойчивых самоассоциатов бензойной кислоты на границе раздела фаз подвижной и неподвижной фаз.

1. Введение

2. Эксперимент

3. Теория

4. Обсуждение

5. Предложения

6. Л.В. Сапрыкин. Рецензия

7. Ответ авторов на замечания Л.В. Сапрыкина

8. К.Е. Федоров. Рецензия

9. Ответ авторов на замечания К.Е. Федорова

Уважаемые коллеги!

Эффект уширения и расщепления пиков ионогенных соединений остается одним из наиболее интересных явлений, наблюдаемых в жидкостной хроматографии.

С точки зрения практической, аналитической хроматографии этот эффект является нежелательным, поскольку приводит к резкому ухудшению разрешения. По этой причине, большинство усилий практиков ВЭЖХ всегда было направлено на поиск простых рецептур, или условий, способных обеспечить отсутствие значительного уширения пиков. Вот некоторые из них:

- 1) закисление элюента при анализе кислот;
- 2) защелачивание элюента при анализе оснований (на полимерных фазах);
- 3) применение модификаторов, как правило, алифатических аминов (триметиламина) при анализе оснований на фазах на основе силикагеля;
- 4) применение концентрированных солевых буферов при анализе оснований на фазах на основе силикагеля;
- 5) применение ион-парных реагентов (этим методом можно как улучшить эффективность в "плохом" случае, так и ухудшить в "хорошем");
- 6) ввод образца, растворенного в элюенте, или в смеси растворителей, максимально схожей по составу с элюентом, но с более слабой элюирующей силой;
- 7) ввод меньшего объема пробы, или пробы с меньшей концентрацией адсорбата.

Вообще говоря, любой хроматографист-практик может применять эти рецепты и не задумываться о том, почему, собственно говоря, они работают.

С точки зрения "фундаментальной науки" (возьмем, к примеру, физическую химию) ситуация выглядит с точностью до наоборот.

В "обычном" случае информация, получаемая из хроматограммы, ограничивается информацией о времени выхода пиков. В случае уширения и расщепления пиков хроматограмма потенциально способна предоставить

гораздо больше информации, чем в "обычном" случае; надо лишь уметь ее извлечь, то есть верно интерпретировать полученные результаты. В целом, для успеха на этом поприще исследователю требуются две вещи:

- 1) грамотно проведенный эксперимент, показывающий воспроизводимый эффект;
- 2) рабочая модель.

В плане эксперимента перед исследователем ставится задача, обратная задаче аналитика: добиться как можно большего уширения и расщепления пика, то есть как можно большего разделения сигнала от одного адсорбата. Чем ярче эффект, тем более правильную модель удерживания можно разработать.

Здесь мы хотим рассказать об одной из своих работ, проведенных по указанной схеме.

Эксперимент

Идея исследования была навеяна наблюдением в некоторых условиях необычных форм пиков органических кислот в обращенно-фазовой хроматографии. Вначале мы задались целью просто поварьировать условия и посмотреть, насколько яркого эффекта можно добиться, и насколько он будет воспроизводим. В качестве адсорбата была выбрана бензойная кислота (БК). Проба была приготовлена в дистиллированной воде, рН около или немного больше 7. В качестве модификатора при приготовлении элюентов применялся ацетонитрил.

При применении в качестве элюента чистого ацетонитрила БК элюируется в виде чрезвычайно широкого пика, не выходящего на базовую линию. Несомненно, в этом случае удерживание обусловлено остаточными силанольными группами, то есть реализуется нормально-фазовый режим хроматографирования. Интересно, что по скорости сужения пика в ряду последовательных инъекций можно судить о скорости насыщения адсорбента бензойной кислотой, и, таким образом, косвенно о плотности его прививки (включая эндкеппинг). Так, по рисункам 1 и 2 можно судить, что сорбент Сепарон С18 силанизирован значительно лучше, чем Силасорб С18, так как остаточная адсорбция бензойной кислоты на Сепароне С18 меньше, чем на Силасорбе С18.

Уже при добавлении к ацетонитрилу 20% воды БК не удерживается, то есть выходит на нулевом времени в виде достаточно узкого пика. Такая картина наблюдается на элюентах "вода-ацетонитрил" различного состава.

В сумме эти факты свидетельствуют о том, что взаимодействиями БК с остаточными силанольными группами при ее элюировании водно-ацетонитрильными элюентами можно пренебречь (и это очень важный момент).

Эксперимент по изучению уширения пика бензойной

Таблица 1. Список элюентов

№	Состав элюента.
1	Ацетонитрил
2	Ацетонитрил - вода 80:20 (об.)
3	Ацетонитрил вода 60:40
4	Ацетонитрил - вода 40:60
5	Ацетонитрил - вода 20:80
6	Ацетонитрил - вода 10:90
7	Ацетонитрил - вода 5:95
8	Вода
9	0.005М раствор KCl в воде
10	Вода, подщелоченная NaOH до pH 8
11	0.0005М водный раствор KН2РO4 - ацетонитрил 90:10
12	0.001М водный раствор KН2РO4 ацетонитрил 95:5
13	Вода + H3PO4, pH 5.7
14	Вода + H3PO4, pH 5.0

Таблица 2. Список примененных хроматографических систем

Элюенты	Хроматографические колонки	Нагрузка
№№ 1-8	Сепарон С18, Диасорб С16, Силасорб С18	300 нг в пике
№ 8	Диасорб С16	50,200,600,1000 нг
№№ 9, 10	Диасорб С16	600 нг
№ 12	Диасорб С16, Диасорб С1, Сепарон С18	600 нг в пике
№ 11	Макропористый полистирол	600 нг в пике
№ 13, 14	Диасорб С16	600 нг в пике

кислоты был проведен достаточно обширный (см. табл. 1 и 2).

В числе первых был проведен эксперимент по последовательному увеличению нагрузки на колонку при элюировании БК водой.

При нагрузке в 1000 нг на колонку 64x2 Диасорб С16Т "пик" имеет два ярко выраженных максимума, и один слабо выраженный максимум (рис. 3г). Тогда, в 1997, при проведении эксперимента мы не знали, что подобные хроматограммы были уже получены Александром Александровичем Кургановым. В своем же исследовании мы тогда пошли дальше.

В частности, задались вопросом: "Что будет, если при нагрузке 600 нг элюирование проводить водой не pH 7, а с более кислой реакцией?" Оказалось, что расщепленный пик растягивается раза в полтора, и приобретает характерную форму "горба верблюда" (см. рис. 4).

При применении элюента "ацетонитрил - 0.001 М однозамещенный фосфат калия" 5:95 получается пик в форме "сапога"; он показан на рисунке 3д. Такая же картина получается, если к элюенту "вода, pH фосфорной кислотой 5.7" добавить раствор KCl до 0.001М и 5% ацетонитрила. То есть второй горб "верблюда" при добавлении неорганической соли превращается в носок "сапога" (ацетонитрил добавляется для уменьшения длины "носка", поскольку объем элюирования ограничен объемом шприца насоса).

Иногда ряд подобных эффектов называют "перекачкой форм". Хотя, по-моему, это по сути неверно, но очень наглядно передает внешние изменения профиля пика.

Далее мы провели две серии экспериментов с хроматограммой типа "сапога".

Первая серия проводилась на колонке 62x2 Диасорб С16Т на элюентах "ацетонитрил - водный раствор однозамещенного фосфата калия" в различном соотношении. В целом, наблюдали следующую закономерность: кислый фосфат и ацетонитрил влияют на форму пика в противоположных направлениях. Увеличение ацетонитрила или/и уменьшение концентрации кислого фосфата приводят к перекачке БК из "носка" в "голень", при этом "носик" посте-



Рисунок 1. Хроматограммы бензойной кислоты. Колонка 64x2 заполнена Силасорбом С18, элюент - ацетонитрил; а) первый ввод пробы, б) второй ввод пробы, в) третий ввод пробы

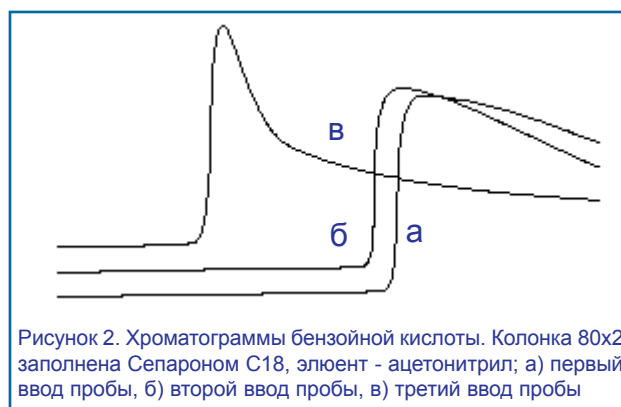


Рисунок 2. Хроматограммы бензойной кислоты. Колонка 80x2 заполнена Сепароном С18, элюент - ацетонитрил; а) первый ввод пробы, б) второй ввод пробы, в) третий ввод пробы

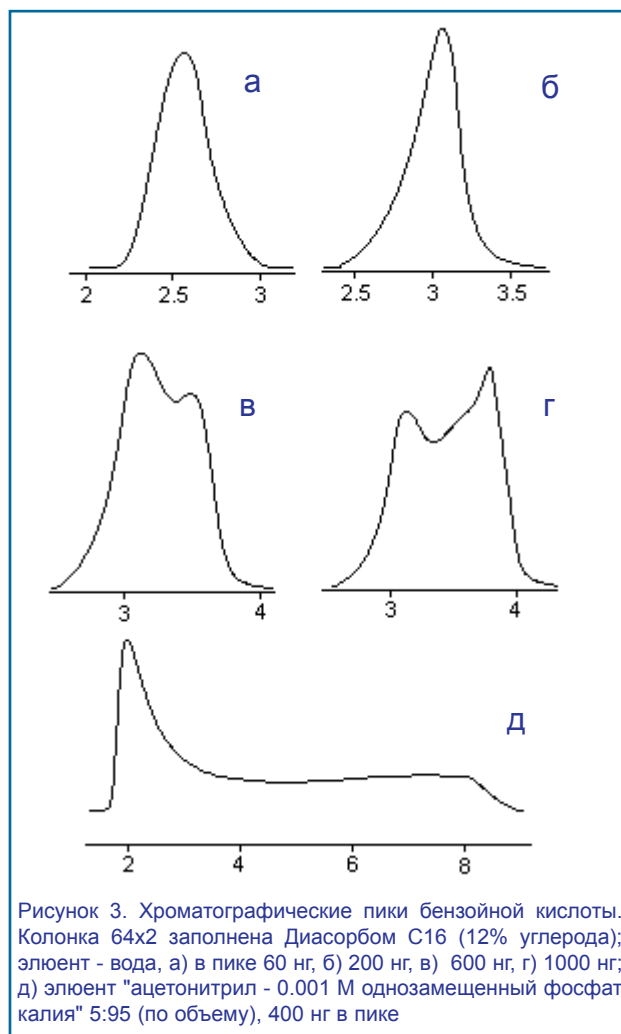
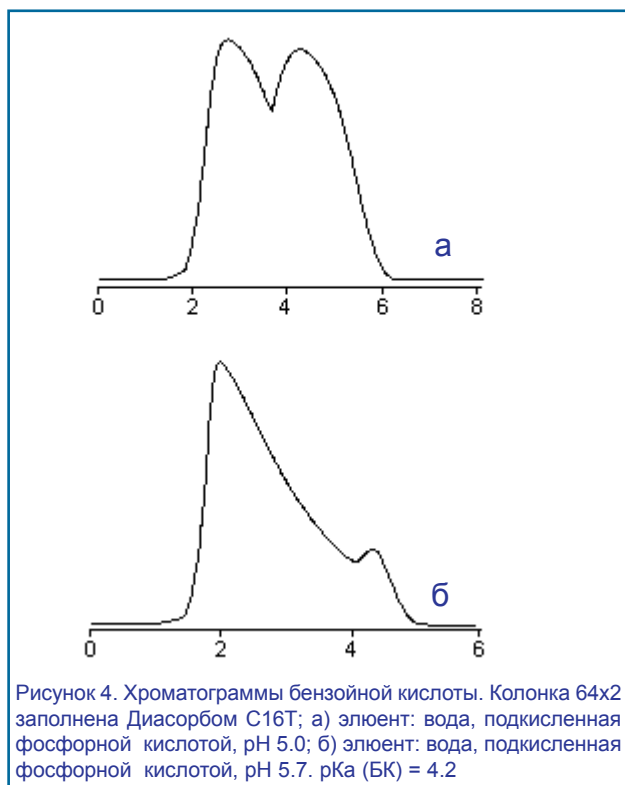
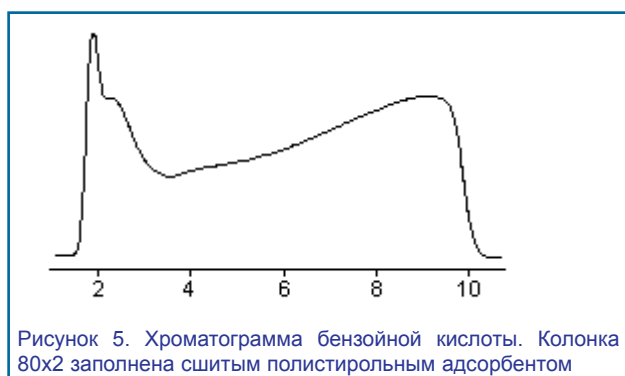


Рисунок 3. Хроматографические пики бензойной кислоты. Колонка 64x2 заполнена Диасорбом С16 (12% углерода); элюент - вода, а) в пике 60 нг, б) 200 нг, в) 600 нг, г) 1000 нг; д) элюент "ацетонитрил - 0.001 М однозамещенный фосфат калия" 5:95 (по объему), 400 нг в пике



пенно становится не ниже, а короче. Уменьшение ацетонитрила или/и увеличение концентрации кислого фосфата приводят к перекачке БК из "голенища" в "носок", при этом "голенище" постепенно исчезает, а "носок" становится все круче и отходит вправо, то есть удерживается сильнее.

Вторая серия проводилась на элюенте "0.0005М водный раствор KH_2PO_4 - ацетонитрил" 90:10; варьировались различные адсорбенты. На С1 силикагеле "носок" едва заметен, на С16 и С18 силикагелях он имеет вид как на рисунке 3д; на полистирольном адсорбенте "носок" значительно больше "голенища" (см. рис. 5). Примечательно, что на этой хроматограмме четко различимы три максимума.



Теория

Обе последние серии экспериментов наглядно подтвердили, что во всех экспериментах БК удерживается по обращенно-фазовому механизму. Более того, перекачка из "голенища" в "носок" качественно согласуется с увеличением доли молекулярной, недиссоциированной формы БК в растворе.

С рабочей моделью дело обстоит не так просто. Допустим, в растворе устанавливается быстрое равновесие

между ионизированной и молекулярной формами; ионизированная форма удерживается меньше, молекулярная - больше. В этом случае кислотный адсорбат должен элюироваться в виде узкого пика, время удерживания которого зависит от рН элюента. В пределе, оно равно времени удерживания молекулярной формы при очень низком рН, и времени удерживания ионизированной формы - при очень высоком рН. В любом случае, пик будет узким, так как все три равновесия (одно кислотно-основное и два адсорбционных) предполагаются чрезвычайно быстрыми.

Для того, чтобы произошло уширение пика, какое-либо равновесие должно быть достаточно медленным, то есть чтобы характеристическое время процесса было бы сопоставимо с временем значительного перемещения хроматографической зоны вдоль колонки.

С расщеплением пика все еще сложнее. Очевидно, что расщепление пика возможно, если медленная стадия связана с равновесием в растворе. Но я не знаю, и не уверен, возможно ли расщепление пика, если медленным является равновесие на поверхности, или медленной является стадия диффузии.

Сначала мы думали, что эффект можно объяснить, если предположить существование на поверхности различных ассоциатов бензойной кислоты. Были проведены предварительные расчеты профиля пика. На программе останавливаться подробно не буду, вкратце - она основана на итерационном алгоритме, на одном шаге которого для каждой "теоретической тарелки" решается система дифференциальных уравнений, описывающих данную хроматографическую систему. Расчеты свидетельствовали в пользу того, что такого предположения недостаточно для объяснения всех фактов. А именно - профиль "сапога" (такой, как на рисунке 5) получался "на колонке", но при дальнейшем "элюировании" крутой "носок" превращался просто в очень длинный "хвост". Тогда у меня (К.С.) не хватило чутья и опыта, чтобы сделать надлежащие выводы и ввести поправку в расчеты. Однако, и тогда было понятно, что необходимого профиля пика не получить, если в предположениях ограничиться только одной формой БК в растворе.

Трудно принять, что в водном растворе может быть более одной устойчивой формы БК - ведь это значило бы, что ассоциаты БК существуют не только на поверхности, но и в самом растворе! Ведь "всем известно", что ничего такого в водном растворе нет. Более того, по всем прикидкам, характеристическое время распада подобных ассоциатов должно составлять порядка десятых секунд или секунд, ты есть быть сравнимым со значительным перемещением хроматографической зоны вдоль колонки. Если меньше, то никаких четко очерченных максимумов не выходит, и уж трех-то - тем более. Два еще можно объяснить достаточно "просто" - допустим, это удерживаемая форма и проскочившая ионная. Но три - гораздо сложнее.

По поводу того, что "ничего такого в водном растворе нет": в растворе такие ассоциаты не могут образовываться. Никто не может однозначно утверждать, что если бы они где-то образовались, то не могли бы в растворе существовать.

Можно, к примеру, вспомнить и про истории с "льдообразной водой". Да, серьезно экспериментально это не подтверждено (пока). Но этот пример я привел, чтобы показать, что идеи такие, вообще-то, не новы.

Как-то Георгий Георгиевич Васияров пошутил по этому поводу, мол, приносит Сычев две пробирки: в одной мономер бензойной кислоты, а в другой - димер. Что ж, в шутке есть и доля шутки...

Здесь стоит упомянуть об одном факте, наблюдавшемся в одном из экспериментов. Речь идет о наблюдении изменения спектральных соотношений в различных участках хроматограммы (в области "голенища" и "носка").

В одном из экспериментов лампа спектрофотометра была отъюстирована таким образом, чтобы луч шел не по центру кюветы, а вдоль ее края. В результате наблюдалось, что спектральные соотношения 230 нм/254 нм в начале и в конце

хроматограммы (см. рис. 5) немного отличаются. Материал кюветы - стекло и... фторопласт. Вот факты. Об остальном можно догадываться и спорить, пока не проведен более точный и спланированный эксперимент.

Мы лишь хотим подчеркнуть, что возможность существования различных ассоциатов бензойной кислоты на границе раздела фаз "неполярная поверхность-водная среда" - это скорее реальность, чем фантастика. Единственно, повторяем, в такой системе должна присутствовать достаточно развитая неполярная поверхность, на которой эти ассоциаты могли бы образовываться.

Обсуждение

Такие рассуждения, в конце концов, приводят нас к биохимии, точнее даже - к биофизике, как сейчас это называется. Образуют ли такие ассоциаты биологически активные вещества на поверхности клеточных мембран, и если да, то какую роль играет образование ассоциатов в процессе связывания этих веществ ферментами? Можно ли моделировать поверхность биологических мембран в хроматографической колонке?

Если первый вопрос очень уж глобальный, то на второй, видимо, можно ответить утвердительно. Такие попытки уже предпринимались, и даже продавались колонки, химически модифицированные ПАВами типа лецитина (головой "наружу"). Да и сейчас доступен ряд "обращенных" фаз с полярной группой "снаружи" привитого лиганда.

Но на таких колонках всегда получались довольно узкие нерасщепленные пики. Почему? Потому как применяли стандартные рецепты подавления расщепления, приведенные выше. Вопрос в другом: почему для элюирования не применяли подвижные фазы, по составу подобные биологической жидкости? Видимо, из-за инерции мышления: расщепленный пик - это неправильно, это не кондиция, брак. Сейчас с этим все поспорят, а тогда все были помешаны на идеальных узких пиках, так что людей можно понять.

Предложения

Вообще, эти исследования хотелось бы продолжить. Есть идеи. Есть уникальные наборы веществ. Есть уникальные адсорбенты, о которых в 97-м мы не могли и мечтать. Нет времени. Будут предложения - обязательно обсудим

Л.В. Сапрыкин. Рецензия на статью С.Н.Сычева и К.С.Сычева "Уширение пиков: "артефакты" или норма?"

В статье поднята интересная проблема, которую часто хроматографисты обходят стороной.

Учитывая дискуссионный характер статьи, выбран вполне подходящий стиль и многие положения постулируются и обсуждаются в предположительном ракурсе.

Следует отметить, что несколько неудачно название статьи. Дословно, "артефакт" - сделанный искусственно. Так действительно некоторые хроматографисты называют паразитные проявления на хроматограмме, типа ложных пиков, реакции на ввод образца и т.п. В плане обсуждаемых по тексту аспектов, назвать статью "Уширение пиков в ВЭЖХ: паразитный эффект или норма?" было бы, на мой взгляд, более логично и правильно. Но, в конце концов - это право авторов давать то или иное название статье.

Соответственно и говорить однозначно о необходимости (или наоборот) избавления от этого эффекта было бы проще, если обозначить цель хроматографического эксперимента. Если это количественный анализ, то однозначно нужно бороться с уширением и асимметрией пика. Если же эксперимент ставится с целью получения неких физико-химических данных, где именно величина уширения и даже расщепления

пика является характеристикой процессов, проходящих в колонке, то, безусловно, нужно добиваться таких условий, чтобы эти эффекты проявлялись наиболее ярко.

Бросается в глаза, что при постановке столь обширного эксперимента в статье не акцентировано, для каких целей использовался тот или иной состав элюента и преимущественно какие процессы авторы хотели таким образом активировать в колонке.

Сразу оговорюсь, расщепление пика БК, как мне кажется, можно объяснить и при несколько других предположениях, нежели только переход БК в разные формы и наличие ее самоассоциации в растворе и на поверхности сорбента. Не стоит забывать процессы смешанной сольватации ионов ВК, которые довольно сильно меняют липофильность данного сорбата. Добавим сюда дисперсионное взаимодействие молекул БК с молекулами ацетонитрила, входящего в состав неполярной НЖФ на поверхности сорбента. Не рассматриваются и некоторые другие немаловажные моменты, которые могут существенно влиять на форму пика БК и приводить к его расщеплению.

И, как верно указывают авторы, проведенного эксперимента явно недостаточно, для четкого доказательства выдвинутых гипотез.

Тем не менее, статья полезна уже тем, что поднимает этот довольно важный вопрос и дает обширный материал для обсуждения и возможности в будущем спланировать эксперимент таким образом, чтобы найти режимы, позволяющие изучать механизмы сорбции веществ различной структуры в условиях ВЭЖХ эксперимента.

Именно грамотная формулировка проблемы и отсутствие в статье категоричных суждений формируют позитивное отношение к авторам данной работы как у специалистов ВЭЖХ, так и у начинающих хроматографистов.

Статью можно публиковать без исправлений (если авторы не согласятся с предложенной корректурой названия), а тему есть смысл вынести в журнале для открытого обсуждения. Вероятней всего хроматографисты вспомнят не один случай аномального хроматографического поведения некоторых веществ из своей практики.

Ответ авторов на замечания Л.В. Сапрыкина

Хотелось бы сделать всего одно замечание - по поводу того, что эффект можно объяснить "и при несколько других предположениях, нежели только переход БК в разные формы и наличие ее самоассоциации в растворе и на поверхности сорбента. ... Не рассматриваются и некоторые другие немаловажные моменты, которые могут существенно влиять на форму пика БК и приводить к его расщеплению".

Если элюент подкислить, то пик будет узким - хотя не изменилось ничего, кроме pH буфера. Так что причиной уширения здесь, видимо, взаимодействия с молекулами растворителя не являются (последние, правда, могут входить в состав комплексов - это не исключено).

Среди возможных причин уширения можно рассматривать также какие-то замедленные диффузионные явления. Чтобы проверить эту гипотезу, элюирование можно провести на ряде неполярных фаз с различной архитектурой носителей.

Е.К. Федоров. Рецензия на статью С.Н.Сычева и К.С.Сычева "Уширение пиков: "артефакты" или норма?"

Постановка задачи напоминает известную медицинскую шутку: "Здоровых людей не бывает, есть плохо обследованные".

По эксперименту могу лишь заметить, что проведенных опытов явно недостаточно для однозначного заключения о природе наблюдаемого эффекта. Хорошим подспорьем мог бы оказаться он-лайн ЯМР, но удовольствие это дорогое малодоступное.

Что же касается возможных выводов, то расщепление пика возможно не только при наличии медленных равновесий в растворе, но и в случае диффузионных ограничений либо медленных реакций в адсорбированном состоянии.

Медленная диффузия из узких пор сама по себе расщепления пика не даст, лишь длинный хвост. Но обычно в узких порах привитых силикагелевых фаз и физико-химия поверхности совсем другая - здесь уже играет роль и "кривизна" поверхности, и стерическая недоступность для модификатора, и, наконец, растворимость самого силикагеля, что может приводить к локальному повышению ионной силы.

Кроме того, ввод проб в вашем случае осуществлялся в чистой незабуференной воде, да и часть хроматографических экспериментов также проводилась в этом элюенте, а это еще один источник неравновесных процессов. В результате "самозабуферивания" равновесная степень ионизации в бензойной кислоты падает с ростом ее концентрации (стремясь к теоретической величине лишь при бесконечном разбавлении). При разбавлении пробы в колонке в случае водного элюента равновесная степень ионизации будет различной по всему профилю пика, и, следовательно, скорость перемещения различных зон разбавления по колонке будет тоже различной, разбавленный передний фронт уйдет еще сильнее вперед, разбавленный задний фронт "наедет" на более концентрированный задний склон пика, еще замедлив его продвижение по колонке. Если на это еще наложится некоторая "бимодальность" пор с разной химией и скоростью диффузии, то хроматографические "верблюды" с ярко выраженными концентрационной и pH зависимостями вполне возможны. Составление математической модели и обсчет возможных сценариев оставляю желающим.

Ну а димеры - пуркуа бы, собственно, и не па - дело за малым, за доказательством...

Ответ авторов на замечания Е.К. Федорова

Общим замечанием рецензентов является указание на нечеткое планирования эксперимента. Думаю, здесь надо расставить все точки над "i". Впрочем, это даже не было исследованием. Это было просто развлечением в период летних каникул. Планировать эксперимент мы не могли, поскольку вообще не имели никакого понятия, что же, собственно говоря, ищем. Просто нам, если угодно, было интересно, что будет, если попытаться максимально уширить/расщепить пик ионогенного соединения. Будет ли он уширяться/расщепляться? Если да, то в каких условиях? Чем все это можно будет объяснить?

Оказалось - да, эффект интересный. Очень просто его не объяснить. Вероятнее всего, этот эффект можно использовать для изучения механизмов удерживания (не формального, а именно "физико-химического"). Менее вероятно, но все же возможно, применять его для изучения самих водных сред.

Таковы предварительные выводы. А спланированного эксперимента - конечно, его никто еще не проводил. Теперь несколько комментариев к гипотезам Евгения. Конечно, гипотезу "самозабуферивания" ("самозащелачивания") мы рассматривали. Действительно, внешне она выглядит очень привлекательно, и, вроде бы, способна объяснить многие вещи без привлечения "высших материй". Однако, если посмотреть на цифры... всего 600 нг, причем размазанные по очень широкой зоне. А в качестве буфера использовался и 10мМ раствор кислого фосфата - немалая буферная сила. Очень маловероятно, что собственная кислотность БК могла как-то повлиять на процесс... в растворе.

Может, она способна как-то повлиять на процесс на поверхности? Простое деление на условную площадь поверхности дает довольно невпечатляющий результат: очень далеки условия от насыщения монослоя. Формально, получается чуть ли не область Генри. Вот тут, как подметил Евгений, может проявляться пресловутая "бимодальность" адсорбентов, а также прочая "чертовщина" с замедленной диффузией в поры. То есть, допустим, БК адсорбируется не всей поверхностью, а лишь какими-то участочками, или "особыми" порами.

Тут не лишне вспомнить другой эффект - "фазового коллапса". Также относится к числу достаточно загадочных явлений, с которым более-менее научились бороться, не слишком глубоко проникая в его суть. Там все связано с ограниченной доступностью аналитов в мелкие поры, что приводит к уменьшению их удерживания и уширению пиков в насыщенных водой и/или соевым буфером средах. Мне кажется, что эффекты "фазового коллапса" и "уширения пика БК" имеют много общего, хотя действуют "с точностью до наоборот" - при фазовом коллапсе удерживание уменьшается, а при уширении пика БК - увеличивается.

Вывод под занавес: господа, не все так просто. И это-то как раз и интересно.

(По результатам двух положительных рецензий статья рекомендована к печати)

Код IIIa