

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

# Динамическое модифицирование в практике ВЭЖХ

Леонид В. Сапрыкин

НТЦ "Кубань-Юг", L.V.Saprykin@kragaz.ru

## Слово от редактора

Как известно, любое хроматографическое разделение можно охарактеризовать тремя основными параметрами: удерживанием компонентов, селективностью их разделения, а также шириной их пиков относительно величины удерживания - эффективностью. Как дополнительный, четвертый параметр, иногда рассматривают форму хроматографического пика, мерой "неправильности" которой является коэффициент асимметрии. Эти четыре параметра в достаточной мере характеризуют хроматографическое поведение веществ в данной хроматографической системе.

В практике жидкостной хроматографии нормой является ситуация, когда сравнительно простые хроматографические системы на основе адсорбента "стандартной" марки и одно- или двухкомпонентного элюента не способны обеспечить оптимальной величины одного или сразу нескольких из перечисленных параметров разделения. В то же время, преимущество жидкостной хроматографии заключается в том, что свойства хроматографической системы можно целенаправленно изменять, варьируя определенным образом состав элюента. Так, квалифицированный хроматографист на основании своего обширного опыта знает, какой дополнительный компонент внести в элюент, или как изменить соотношение компонентов, чтобы увеличить или, наоборот, уменьшить удерживание отдельных компонентов, отрегулировать селективность, улучшить эффективность или убрать асимметрию.

В частности, существует достаточно большой круг веществ, которые даже в небольшой концентрации могут существенно повлиять на один или несколько параметров разделения. Они могут применяться как в виде добавок к элюенту, так и в виде растворов для предварительной обработки применяемых адсорбентов. Эти вещества в среде хроматографистов принято называть динамическими, или адсорбционными, модификаторами, а сам технический прием по их применению - динамическим (адсорбционным) модифицированием.

Способность специалиста предугадывать поведение хроматографических систем во многом обусловлена именно знанием механизма действия конкретных динамических модификаторов. В принципе, эти знания не являются какими-то экстраординарными по своей сути. Начинаящий пользователь, не-хроматографист (желательно, однако, с химическим образованием) легко может сходу освоить несколько наиболее распространенных рецептур динамического модифицирования, что значительно расширит его арсенал средств при оптимизации условий необходимых ему анализов. Дело тормозится лишь отсутствием хорошей методической литературы по этому вопросу. Популяризация этой темы в крупнотиражной отечественной печати началось сравнительно недавно; можно отметить работы С.Н. Сычева, который сформулировал эмпирические правила регулирования удерживания, селективности и эффективности в обращенно- и нормально-фазовых режимах, и работы О.Б. Рудакова, в которых особо выделяется роль растворителя как регулятора свойств хроматографических систем.

Наконец, мы дождались по этой теме и обобщающей работы Л.В. Сапрыкина - не просто специалиста, а, скорее, кудесника метода динамического модифицирования. Ему, как говорится, и карты в руки.

Сразу стоит отметить его комплексный подход к тематике. Многие хроматографисты привыкли к термину "динамическая модификация адсорбента"; автор же подчеркнуто говорит о модификации хроматографической системы, то есть распространяет понятие динамической модификации и на взаимодействия адсорбата с элюентом. В этом его взгляды перекликаются с позицией С.Н. Сычева, обосновавшим теорию сольватного комплекса адсорбата в нормально-фазовом режиме.

Обширной областью научной деятельности Л.В. Сапрыкина является исследование систем, в которых элюенты, составленные из воды, соли и органического растворителя (в большинстве случаев - ацетонитрила) близки к точке расслоения фаз. Этот вид хроматографии назван им режимом динамически индуцированного раздела фаз (ДИРФ). По всей видимости, наиболее интересно и перспективно применение ДИРФ-режима в гидрофильной хроматографии на немодифицированном силикагеле, хотя внимания также заслуживает и его реализация в обращенно-фазовом варианте на сорбентах с химически привитыми фазами. Примечательно, что многие нормально-фазовые системы на основе силикагеля с элюентами, к примеру, гексан-изопропанол-этиленгликоль, гексан-изопропанол-водный буфер, которые в ряде случаев до сих пор применяются на практике, также можно отнести к разновидности ДИРФ-систем.

ДИРФ-системы являются чрезвычайно гибкими и чувствительными к условиям эксперимента и внешним воздействиям. По мнению автора, это свойство может помочь при исследовании хроматографическим методом поверхностей адсорбентов и процесса образования на них тонких пленок одного из компонентов элюента. Поддерживая это предположение, можно вслед заметить, что ДИРФ метод также можно применять для исследования структуры самих жидких сред вблизи точки расслоения фаз.

Многие ученые заражены здоровым скептицизмом по поводу всяких исследований такого рода, однако преследующие одиночек неудачи на этой ниве являются следствием, скорее, неверных подходов, нежели отсутствием таковых вообще. Кстати, одним из интересных объектов (или эффективных инструментов) исследования могут служить хиральные (оптически активные) фазы, дающие еще один дополнительный параметр удерживания - селективность разделения пары энантиомеров.

Однако, это уже сугубо научная тематика. Для практиков метода ВЭЖХ в большей степени будет интересна представленная Л.В. Сапрыкиным классификация режимов с динамическим модифицированием. По сути, в сводной таблице приведены как раз те добавки, которые позволяют целенаправленно и быстро добиваться улучшения требуемых параметров разделения путем применения динамического модификатора. При этом начинающие хроматографисты могут применять эти рецептуры по принципу "бери и пользуйся", не задумываясь о механизме их действия.

1. Общие вопросы применения динамического модифицирования
2. Динамическое модифицирование обращенно-фазовых хроматографических систем
3. Динамическое модифицирование нормально-фазовых хроматографических систем
4. Динамическое модифицирование в граничных условиях
5. Методология изучения систем с динамическим модифицированием
6. Литература
7. С.Н. Сычев. Рецензия на статью (с ответами автора)

Уважаемые коллеги!

Под динамическим модифицированием (ДМ) обычно понимают введение в состав элюента различных компонентов, которые, постоянно взаимодействуя с компонентами элюента и поверхностью сорбента, направленно меняют свойства хроматографической системы.

В отличие от предварительного (химического) модифицирования, эти целевые добавки в элюенте присутствуют, как правило, постоянно, в том числе и непосредственно при протекании процесса разделения анализируемых веществ.

Обобщая приводимые в научной литературе цели использования того или иного модификатора, можно выделить следующие основные задачи, решение которых, по мнению авторов, призвано обеспечить динамическое модифицирование:

- устранить или уменьшить неоднородность свойств поверхности сорбента,
- подавать механизмы разделения, сопутствующие основному,
- значительно изменить липофильность (гидрофильность) поверхности сорбента,
- изменить механизм сорбции разделяемых веществ.

Следует обратить внимание, что некоторые пункты перекрываются по вложенному в них смыслу. Тем не менее, такое построение лишней раз иллюстрирует неоднозначность подхода разных исследователей к механизмам разделения в ВЭЖХ вообще, и при динамическом модифицировании - в частности.

Кроме того, добавки в элюент определенных веществ могут использоваться для решения каких либо частных задач, например - стабилизации условий разделения, облегчения детектирования сорбатов или предотвращения разложения лабильных органических веществ в колонке. В этом случае, по некоторым воззрениям, добавка может и не взаимодействовать напрямую с поверхностью сорбента, но обязательно существенно влияет на установление равновесия в системе сорбент-сорбат. Учитывая, что на механизм действия таких добавок единых взглядов в среде хроматографистов тоже не существует, их также будем рассматривать в качестве динамических модификаторов.

Именно поэтому было бы более правильно говорить о динамическом модифицировании всей хроматографической системы сорбент-сорбат-элюент, а не только сорбента. Тем более, что рассмотрение сорбента в отрыве от находящегося с ним в равновесии элюента и сорбатов может быть только умозрительным.

Исходя из определения, динамическое модифицирование сорбентов в ВЭЖХ используется значительно чаще, чем об этом принято думать. Строго говоря, разделениями без динамического модифицирования можно считать лишь таковые, проводимые на одноконпонентных элюентах, что на практике встречается крайне редко. И в научной литературе полярная добавка для нормальнофазовой хроматографии и неполярная - для обращеннофазовой иногда называются модификаторами [1]. Чтобы не вносить путаницу в терминологию, под динамическим

модификатором (модифицирующим агентом) будем понимать различные добавки в двухкомпонентный элюент, призванные тем или иным образом изменить характеристики разделительной системы "сорбент - сорбат - элюент". Причем, часто необходимо одновременно изменить несколько таких характеристик.

Именно по этой причине для ВЭЖХ-разделения большинства веществ используют довольно сложные по составу элюенты. Это вызвано, в первую очередь, неидеальностью свойств поверхности сорбента и неоптимальными ее свойствами для реализации конкретных хроматографических задач.

Динамическое модифицирование одинаково часто применяется при реализации как обращенно-фазового (ОФ), так и нормально-фазового (НФ) режимов ВЭЖХ.

Далее ДМ будет намеренно рассмотрено в несколько более широком аспекте, чем привыкли понимать этот методический прием некоторые специалисты. Это позволит обсудить очень интересные и необычные хроматографические приложения с использованием различных модифицирующих агентов, механизм действия которых на хроматографическую систему до конца еще не выяснен или имеет неоднозначные толкования в научной литературе на основе известных теорий сорбции.

Следует помнить, что, как правило, добавка динамического модификатора в элюент - мера вынужденная, и за возможность улучшить форму пика или качество разделения порой приходится платить худшей повторяемостью методики разделения, а также меньшей воспроизводимостью условий хроматографирования.

Кроме того, нужно учитывать тот факт, что взаимодействие модификатора с сорбентом зачастую происходит весьма сложным образом и, наряду с улучшением некоторых параметров хроматографической системы, в качестве побочного эффекта можно получить значительное непредсказуемое изменение удерживания некоторых веществ (особенно примесей, строение которых, как правило, неизвестно), подключение совершенно новых механизмов разделения и т.п., что далеко не всегда является желательным. В некоторых случаях все это может являться собой кардинальное изменение процесса пробоподготовки. Вдобавок к этому, модификатор может добавить проблем при реализации препаративных хроматографических разделений, так как неизбежно усложняет выделение целевых веществ из элюента.

Довольно часто забывают, что некоторые динамические модификаторы в остаточных, но ощутимых количествах, довольно прочно "салятся" на сорбент и полностью вымыть их из колонки не представляется возможным. Значит, однажды подвергнутая динамическому модифицированию колонка никогда уже не будет обладать такими же свойствами, что и новая. Даже неполярные сорбаты будут вести себя на такой колонке совершенно по-другому, нежели на новой.

Таким образом, подходить к выбору модификатора нужно взвешенно и осторожно, а использовать динамическое модифицирование есть смысл, только если это действительно необходимо и оправдано.

В настоящее время выпускается широчайший ассортимент сорбентов на основе химически модифицированного силикагеля, в том числе и предназначенных для реализации специальных режимов разделения. Использование колонок, упакованных такими сорбентами, часто позволяет отказаться от жесткого динамического модифицирования хроматографической системы. Однако, наряду с высокими эксплуатационными характеристиками, эти колонки имеют и довольно высокую стоимость, что сильно ограничивает их широкое распространение, особенно в лабораториях стран СНГ. В то же время у пользователей ВЭЖХ имеется в наличии огромное количество колонок, заполненных низкокачественными и морально устаревшими сорбентами, обладающих только минимально допустимыми хроматографическими параметрами. В этом случае только ДМ дает шанс успешно

использовать такие сорбенты для решения хроматографических задач повышенной сложности. Именно по этой причине большинство приведенных далее практических приложений выполнено с использованием широко распространенных и дешевых сорбентов. Тем не менее, если задача решается на приемлемом уровне при использовании ДМ на таких сорбентах, то априори можно утверждать, что при использовании такого же методического приема с более качественными и современными сорбентами, результаты получатся, как минимум, не хуже.

### Динамическое модифицирование обращенно-фазовых хроматографических систем

Единой, всеми признанной теории сорбции на неполярных силикагелевых сорбентах до сих пор не существует. В работе [2] выделяется пять основных взаимоисключающих предположений по реализации механизмов удерживания в ОФ хроматографии. Тут же отмечается, что ни одна из приведенных теоретических моделей удерживания адекватно и полно не описывает процессы, происходящие в хроматографической системе. Все они примерно равнозначны и для описания хроматографического разделения может быть использована любая из них. По этой же причине есть смысл избегать терминов "адсорбция" (сорбция поверхностью твердого субстрата за счет дисперсионного взаимодействия) и "абсорбция" (сорбция за счет растворения в объеме НЖФ), сужающих и конкретизирующих понятие сорбции.

Правильнее, конечно, было бы жестко не придерживаться какой-то одной теории сорбции, поскольку все они базируются на упрощающих предположениях и не могут по отдельности описать все аспекты такого сложного физико-химического явления, как сорбция в хроматографической системе. Для упрощения восприятия при рассмотрении физических моделей сорбции достаточно опираться на ту теорию, которая в данных условиях хроматографирования наиболее полно описывает именно рассматриваемые аспекты закономерностей сорбции-десорбции изучаемых веществ и наиболее полно коррелирует с экспериментально полученным массивом хроматографических данных. В некоторых случаях, если это помогает лучше понять происходящие в колонке процессы, есть смысл делать некую компиляцию из двух и более теорий (моделей) сорбции.

На взгляд автора, наиболее полно закономерности хроматографического разделения на неполярных сорбентах в присутствии динамического модификаторов описывает модель абсорбционного взаимодействия в системах сорбент-сорбат на основе сольвофобного эффекта [3]. То есть, предполагается, что в хроматографической системе реализуется распределение сорбата между двумя несмешивающимися жидкостями, одна из которых - элюент, а другая - неподвижная жидкая фаза (НЖФ), состоящая из неполярных фрагментов химически пришитого агента и сорбированного на нем малополярного компонента элюента. Такой подход позволяет довольно точно предсказать, по крайней мере, качественные изменения в хроматографической системе при ее динамическом модифицировании.

Наиболее часто динамическое модифицирование в практике ОФ ВЭЖХ применяют для подавления активности свободных силанольных групп при разделении полярных сорбатов, для увеличения удерживания и улучшения формы пика органических кислот и оснований (так называемая, ион-парная хроматография), а также - для реализации ионообменного механизма разделения. Как уже говорилось, динамическое модифицирование может выполнять сразу несколько функций.

Если на ОФ хроматографируются нейтральные слабополярные соединения, то, скорей всего, можно не опасаться отрицательного влияния на качество разделения свободных силанольных групп, а также проявления побочных

механизмов сорбции. В этом случае в качестве элюента вполне подойдут водные растворы ацетонитрила или низкомолекулярных спиртов без каких-либо модифицирующих добавок. Напротив, если сорбаты имеют высокую полярность, да к тому же проявляют ярко выраженные кислотные или основные свойства, без динамического модифицирования симметричной формы пиков и качественного разделения получить наверняка не удастся.

С целью динамического модифицирования в обращенно-фазовой ВЭЖХ производят добавки в элюент органических и/или минеральных кислот, органических оснований и солей, а также ПАВ различной структуры.

Для подавления диссоциации кислых силанольных групп и снижения доли участия ионообменного механизма разделения при преобладающем распределительном, используют добавки достаточно сильных органических или минеральных кислот, а также буферных систем на их основе. В этом случае стерически доступные силанольные группы находятся в недиссоциированном состоянии и могут взаимодействовать с сорбатами только за счет образования довольно слабых водородных связей. Это наиболее мягкий вариант воздействия на хроматографическую систему, не вызывающий резкого изменения липофильности и удерживания полярных сорбатов.

Правда, существует, основанное на изучении особенностей хроматографического поведения бензойной кислоты мнение [4], что влияние силанольных групп на процесс хроматографии в обращенно-фазовом режиме зачастую сильно преувеличивается некоторыми исследователями. По этому воззрению, форма пиков высокополярных веществ искажается больше за счет образования ассоциатов в растворе, а также неполного или неравновесного протекания процессов диссоциации и сольватации ионогенных сорбатов. Эта модель неплохо компилируется с известными ранее теориями сорбции и позволяет рассмотреть изменение хроматографических характеристик системы как суперпозицию изменения свойств поверхности сорбента и трансформации сольватной оболочки сорбата, что дает возможность взглянуть на процесс разделения в ВЭЖХ несколько шире.

При необходимости более кардинального изменения условий сорбции-десорбции аналитов, приходится прибегать к достаточно жестким воздействиям на хроматографическую систему. В ход идут небольшие добавки алкиламинов, этаноламинов и тетраалкиламмониевых солей. Но при этом и свойства сорбента меняются весьма значительно - его поверхность приобретает ярко выраженные ионообменные свойства, что может проявиться падением эффективности колонки, изменением порядка выхода анализируемых соединений, а также недопустимо прочной сорбцией некоторых компонентов пробы в колонке. Типичным жестким модификатором для обращенной фазы являются соли тетраалкиламмония и акилсульфонаты с относительно короткими алкильными цепями (до С12). В их присутствии поведение сорбента по отношению к органическим кислотам и основаниям меняется столь существенно, что это вид хроматографии выделили из классической обращенно-фазовой и назвали ион-парной. Хотя, на взгляд автора, такое название даже в первом приближении не отражает процессы, в действительности происходящие в хроматографической колонке.

По одному из воззрений, механизм разделения в этом случае основан на потере полярности ионогенными органическими молекулами за счет образования в растворе ассоциатов, названных ионными парами.

Однако, исходя из основных положений теории электролитической диссоциации и величин соответствующих констант, такой ход событий маловероятен. Дело в том, что в водных и водно-органических растворах гидроксид тетрабутиламмония, например, гораздо более сильное основание, чем даже гидроксид калия. И, сколь бы слабая кислота не представляла анион для образования соли, представить эту соль не полностью диссоциированной просто

невозможно. Да, безусловно, далее пройдет гидролиз в соответствии с рК кислоты, но ионные пары, как сколь ни будь устойчивое образование в водно-органических растворах - явление чисто умозрительное. То же можно сказать и об анионах сульфокислот. При реализации ион-парной ВЭЖХ гораздо более вероятна сорбция ПАВ липофильным концом на пришитый алкил сорбента, эндкепирование in situ гидрофильным концом катиона модификатора остаточных силанольных групп, с последующей сорбцией на алкильные "хвосты" новых ионов ПАВ таким образом, что на всей поверхности сорбента доступными для взаимодействия с разделяемыми веществами остаются полярные гидрофильные группы, на которых и происходит разделение компонентов преимущественно по ионо-обменному и конкурентному механизмам. Ярко выраженное влияние на удерживание основности сорбатов, ионной силы и pH элюента косвенно подтверждает реализацию именно таких механизмов разделения. Дисперсионное взаимодействие липофильных участков сорбента и модификатора складывается с силами поверхностного натяжения, что делает сорбцию ПАВ необычайно прочной. Полностью отмыть сорбент от модификатора, как уже говорилось, практически невозможно.

Тем не менее, название этого методического приема в ВЭЖХ сложилось исторически и, чтобы не вносить путаницу, и далее будем называть его ион-парной хроматографией.

Воздействие на удерживание сорбатов ион-парного модификатора в ОФ ВЭЖХ тем сильнее, чем выше (до определенного предела) его концентрация в элюенте, длиннее алкильный "хвост" и чем более кислые или основные свойства проявляет сорбат. Рассмотрим хроматографическое поведение высокополярных веществ, обладающих свойствами оснований - витамина В6 и полупродуктов его промышленного синтеза по методу Харриса - Фолкерса [5].

В этом случае стоит задача разделить четыре вещества: 2-метил-3-окси-4-формил-5-метоксипиридин (пиридоксаль); 2-метил-3-окси-4,5-диметоксипиридин (пиридоксин), 2-метил-3-окси-4-метоксиметил-5-оксиметилпиридин (эфир пиридоксина) и 2-метил-3-амино-4-метоксиметил-5-аминометилпиридин (диамин пиридоксина).

При анализе на ОФ без жесткого динамического модифицирования эти вещества удерживаются очень плохо (рис. 1). При концентрации метанола всего 4% в 0,02М фосфатном буфере и pH=3 едва-едва делаются пиридоксин, эфир пиридоксина и диамин пиридоксина. В случае небольшого падения эффективности колонки, разделение становится уже недостаточным, а хроматографисту даже нет возможности восстановить качество разделения путем уменьшения элюирующей силы подвижной фазы, так как она и без того минимальна. Кроме того, в этих условиях изначально не делаются пиридоксин и пиридоксаль.

Если подходить строго, компоненты фосфатного буфера (дигидрофосфат калия и фосфорная кислота) в данном случае - тоже модификаторы, но в этих концентрациях они всего лишь стабилизируют pH, а значит - липофильность сорбатов, и влияют на удерживание анализируемых веществ в колонке не очень существенно.

Добавка же в элюент додецилсульфата натрия до концентрации всего 0,0005М переводит хроматографическую систему в ион-парный режим. Это приводит не только к изменению порядка выхода веществ, но и к столь значительному увеличению их удерживания, что даже при концентрации метанола в подвижной фазе 40%, выхода из колонки диамина пиридоксина приходится ждать почти 20 мин (рис. 2). Это, по-видимому, связано с тем, что диамин пиридоксина является трипротонодентатным (трехцентровым) основанием, причем с разной силой и стерической доступностью своих центров основности. Это же обстоятельство обуславливает аномально большую асимметрию формы пика диамина в данных условиях. Нельзя также сказать, что и разделение остальных компонентов вполне удовлетворительно, но, тем не менее, уже удалось добиться четкого разделения пиридоксина с

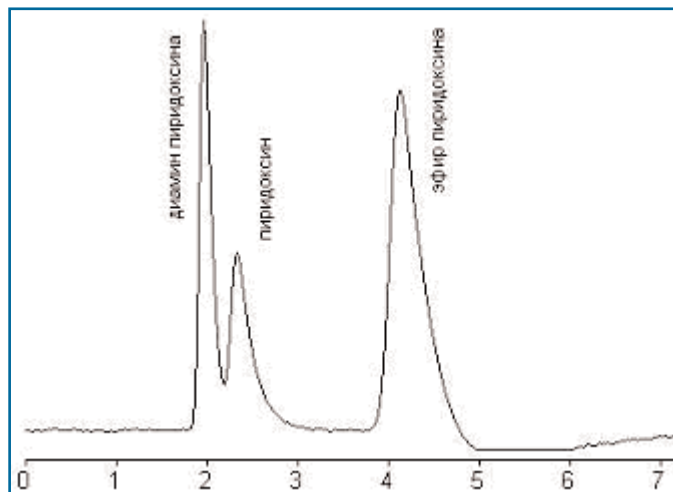


Рисунок 1. Хроматограмма модельной смеси витамина В6 и полупродуктов его синтеза. Хроматограф: Милихром 4, УФ детектирование при 290 нм; колонка: КАХ 4; элюент: 4% метанола в 0,02М фосфатном буфере, pH=3

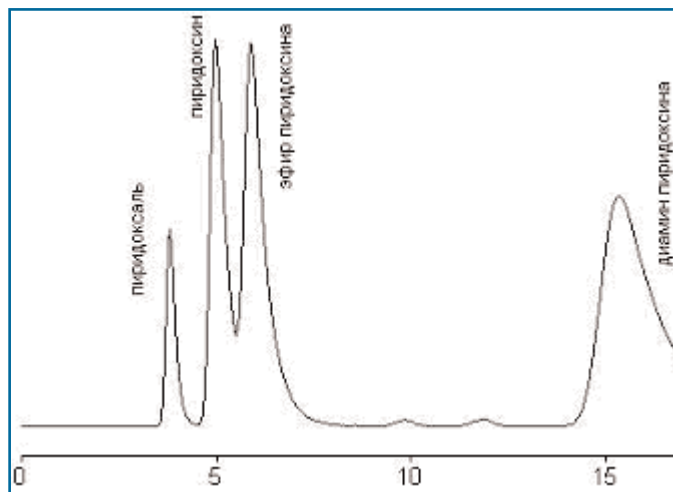


Рисунок 2. Хроматограмма модельной смеси витамина В6 и полупродуктов его синтеза. Хроматограф: Милихром 4, УФ детектирование при 290 нм; колонка: КАХ 4; элюент: 40% метанола в 0,02М фосфатном буфере с добавкой 0,0005М додецилсульфата натрия, pH=3

пиридоксалем, а у хроматографиста появилась дополнительная степень свободы (концентрация метанола) для увеличения разделительной способности данной системы.

Для обеспечения более качественного и быстрого разделения сорбатов, в данном случае есть смысл перейти в градиентный режим элюирования, что не всегда удобно или даже возможно. Можно также использовать более короткоцепочные модификаторы, например, октил- или гексилсульфонат, которые дороже и менее доступны, чем додецилсульфат, но позволяют существенно "сжать" хроматограмму даже в изократическом режиме. Как будет показано далее, эту задачу, опять же, при помощи динамического модифицирования, удалось решить гораздо более красиво и просто.

В общем случае, для реализации ион-парного механизма при разделении кислых сорбатов используют соли тетраалкиламмония, а при хроматографии органических оснований - алкилсульфонаты. Тем не менее, если речь идет о хроматографии полифункциональных соединений, выбор типа ион-парного модификатора уже не столь очевиден.

Примером такой ситуации является хроматографический анализ морфина в биологических жидкостях. В обращенно-фазовом режиме этот алкалоид удерживается недостаточно сильно и зачастую выходит в окружении множества примесей, что может отрицательно сказаться на достоверности идентификации его пика на хроматограмме и значительным ошибкам при количественном определении. Поэтому перед дозированием образец должен быть тщательным образом очищен от основных примесей, что усложняет весь ход анализа и снижает экспрессность его проведения. Добавка же в элюент фосфата тетрабутиламмония значительно увеличивает время выхода морфина и позволяет сместить его пик в чистую от примесей область хроматограммы (рис. 3). Это становится возможным благодаря тому, что морфин, проявляя преимущественно свойства основания, тем не менее, имеет фенольный гидроксил, обеспечивающий ему некоторые кислотные свойства.

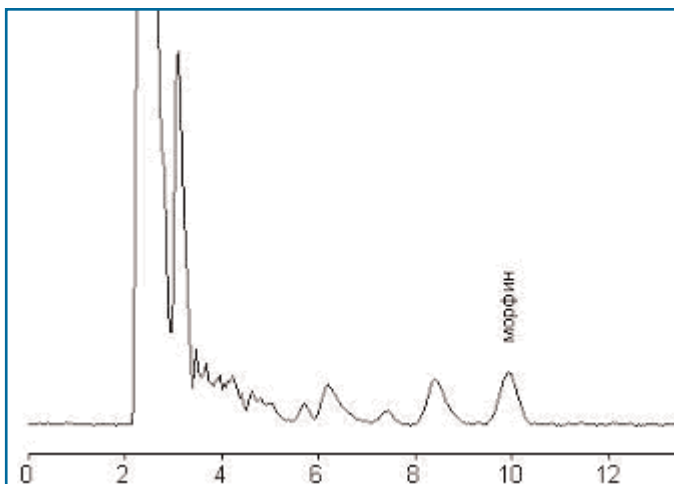


Рисунок 3. Хроматограмма спиртового раствора экстракта из желчи наркомана. Хроматограф: Милихром-4, УФ детектирование 220 нм; колонка: Диасорб-130-Амин, 2x120 мм, элюент: Ацетонитрил - 0,005М раствор тетрабутиламмоний фосфата (85:15), 200 мкл/мин. Хроматограмма любезно предоставлена А.В.Удаловым (если не указан источник, данные получены автором)

Еще один вариант динамического модифицирования с глубоким изменением механизма и основных закономерностей удерживания - это перевод обращенной фазы в сильный анионообменник. Такая трансформация сорбента позволяет проводить методом ВЭЖХ разделение и анализ неорганических анионов. Преобразование C18 в анионообменник происходит при динамическом модифицировании сорбента солями октадецил- или цетилтриметиламмония, которые добавляются в элюент на уровне 0,001 - 0,01 М/л. Механизм его действия схож с воздействием на ОФ сорбент тетраалкиламмониевых солей при реализации ион-парного варианта ВЭЖХ, но за счет очень длинного углеводородного "хвоста", сорбция этого модификатора происходит очень прочно и достигается максимальное удерживание анионов на сорбенте.

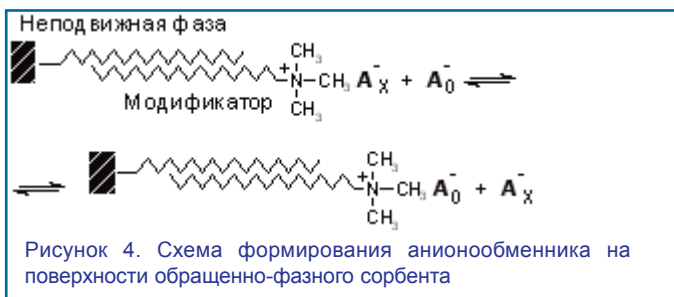


Рисунок 4. Схема формирования анионообменника на поверхности обращенно-фазового сорбента

Прочность сорбции модификатора такова, что можно обойтись без постоянного присутствия модифицирующего агента в элюенте, достаточно провести предварительное модифицирование колонки *in situ* и в дальнейшем его периодически повторять перед каждой серией анализов.

Но даже в этом случае остаточные количества аниона модификатора могут проявиться на хроматограмме, что видно из рис. 6 (пик бромидов отмечен \*). Поэтому в качестве противоиона к катиону модификатора есть смысл выбирать анион, не входящий в состав анализируемых анионов, например, тетрафторборат-ион.

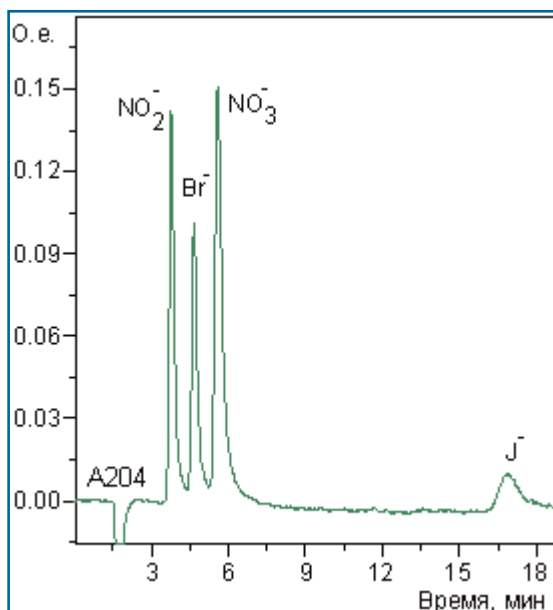


Рисунок 5. Разделение поглощающих в УФ анионов на динамически эмульгированном анионообменнике. Хроматограф: Милихром 5, колонка: КАХ 4, элюент: 0,5М раствор фторида натрия; колонка предварительно модифицирована 0,01М раствором бромидов октадецилтриметиламмония. (Методика разработана Г.И.Барамом)

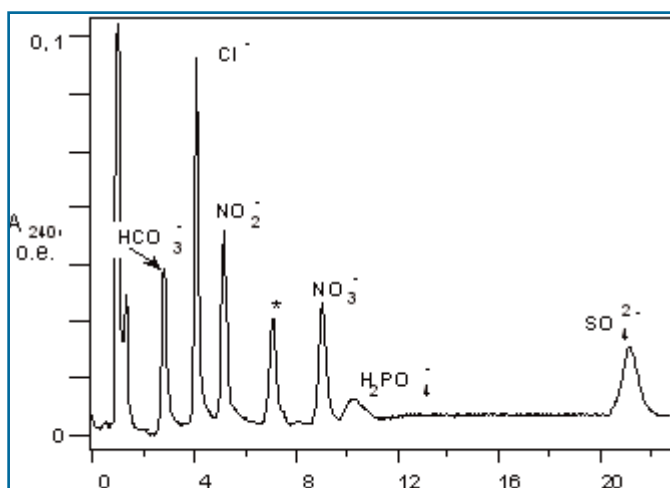


Рисунок 6. Разделение непоглощающих в УФ анионов на динамически эмульгированном анионообменнике при косвенном инверсном детектировании. Хроматограф: Милихром 5, колонка: КАХ 4, элюент: 15% ацетонитрила в 0,0016М растворе бифталата калия, pH=8,9; колонка предварительно модифицирована 0,01М раствором бромидов октадецилтриметиламмония. (Методика разработана Г.И.Барамом)

Как видно из рис. 4, многоцентровое дисперсионное взаимодействие неподвижной фазы с липофильным участком ПАВ, приводит к формированию классического сильного анионообменника, на котором по конкурирующему механизму происходит разделение анионов. То, что превалирует именно ионообменный механизм сорбции анионов, свидетельствует тот факт, что на удерживание очень сильно влияет ионная сила элюента, которая и является основным средством регулирования прочности удерживания анионов.

Если провести добавку в элюент анионогенного ПАВ с длинной алкильной цепью, например, гекса- или октадецилсульфоната натрия, на поверхности сорбента сформируется сильный катионообменник. Правда, вести анализ неорганических катионов методом ВЭЖХ нецелесообразно ни по чувствительности и точности определения, ни по стоимости такого анализа. Тем не менее, используя динамическое модифицирование, принципиально это довольно легко осуществить.

### Динамическое модифицирование нормально-фазовых хроматографических систем

Как и для ОФ, единых представлений о механизме сорбции на силикагеле до сих пор также не существует [2] и пока ограничивается тремя теориями. Одно время большинство исследователей рассматривали силикагель, как адсорбент, полярные свойства которому придают поверхностные силанольные группы. Дальнейшее изучение структуры и поверхностных свойств силикагеля показало, что кроме силанольных групп на своей поверхности силикагель удерживает тонкую пленку воды. Это обстоятельство позволило взглянуть на механизм нормально-фазового разделения с несколько иной точки зрения.

Действительно, если рассматривать сорбированную на поверхности силикагеля воду как полярную НЖФ, можно предположить, что разделение на силикагеле происходит с реализацией в той или иной степени распределительного механизма (абсорбция). Фазовое разделение НЖФ и элюента обуславливается капиллярным расслаиванием в порах.

Автору также в большей степени импонирует эта гипотеза, тем более, что она получила достаточно прямых и косвенных экспериментальных подтверждений как по литературным данным, так и по опыту собственных практических работ.

Так, например, оказалось, что силикагель неплохо имитирует водную фазу при изучении экстракции органическими растворителями из водных растворов анионных комплексов, в частности, молибденовых гетерополикомплексов [6]. Изучение хроматографического поведения комплексов на силикагеле методом тонкослойной хроматографии позволило установить четкую зависимость  $R_f$  от величины коэффициента распределения в системе вода-растворитель, что дало возможность по хроматографическим данным определять эти параметры с достаточной точностью, не прибегая к длительному и громоздкому эксперименту.

То, что вода, сорбированная на силикагеле, играет далеко не последнюю роль при нормально-фазовых хроматографических разделениях сейчас известно практически каждому хроматографу. На заре жидкостной хроматографии именно это обстоятельство доставляло экспериментаторам массу хлопот при реализации НФ разделения на силикагеле в элюентах, содержащих почти чистый гексан (или другой неполярный растворитель). Невоспроизводимость времен выхода сорбатов и значительное время уравнивания сорбента с элюентом как раз и были следствием изменения содержания воды в приповерхностном слое силикагеля.

Таким образом, исторически первым вариантом динамического модифицирования сорбентов в НФ ВЭЖХ стали различные добавки в элюент, призванные стабилизировать содержание воды в приповерхностном слое

сорбента. В качестве таких добавок применялись вода, многоатомные спирты, карбоновые кислоты и алкиламины. Следует отметить, что некоторые модификаторы в нормально-фазовом режиме, как и в обращенно-фазовом режиме, выполняют дополнительно еще ряд других, необходимых для успешного разделения сорбатов функций. Так, например, карбоновые кислоты (уксусная, пропионовая) подавляют диссоциацию силанольных групп, предотвращая сорбцию на них органических оснований по ионообменному механизму.

Эффект "буферирования" поверхности силикагеля проявляется и при динамическом модифицировании его многоатомными спиртами (этиленгликоль, глицерин, пентаэритрит). В этом случае спирты образуют с наиболее активными силанольными группами водородные связи, предоставляя сорбатам для взаимодействия не склонные к диссоциации спиртовые группы, что благотворно сказывается на разделении пептидов, аминокислот и других веществ основного характера. Не случайно в ассортимент химически модифицированных силикагелей входит сорбент с пришитой диольной группой и предназначенный для этих же целей.

При разделении в нормально-фазовом варианте кислых сорбатов, карбоновые кислоты в качестве модификатора устраняют образование водородных связей анализируемых веществ с силанольными группами, обеспечивая тем самым разделение по наиболее выгодному механизму сорбции - распределительному. С этим вариантом, по механизму воздействия на хроматографическую систему, весьма схожа еще одна разновидность динамического модифицирования, применимая как на октадецилсиликагеле, так и на неизмененных силикагелях. Она заключается в добавке в элюент соединений, близких по своей функциональности к анализируемому. В этом случае реализуется конкурентный вытесняющий механизм разделения, когда молекулы модификатора вытесняют с поверхности сорбента анализируемое вещество. Это позволяет в ряде случаев значительно сократить время анализа, а иногда и отказаться от градиентного элюирования, что, безусловно, способствует воспроизводимости и точности количественного анализа, а также надежности идентификации компонентов пробы. В частности, именно с этой целью в элюент проводят добавки диэтил- или триэтиламина при анализе алкалоидов и других органических оснований.

Многие типы динамического модифицирования для нормально-фазового режима хорошо изучены. Особенно это касается добавок карбоновых кислот, спиртов и воды. А в [7] даже сделана небезуспешная попытка формализовать закономерности поведения сорбатов на динамически модифицированном силикагеле в виде полупирической математической модели.

Тем не менее, в этих работах не ставилась цель изучения динамического модифицирования силикагеля в более широком плане, а именно - в аспекте перехода хроматографических систем с неизменными силикагелями под действием модификатора в другие режимы разделения. Однако, как раз эти варианты ДМ представляют наибольший практический интерес.

Это тем более привлекательно, что обычные силикагели дешевле химически модифицированных\*, гораздо более воспроизводимы по свойствам и способны довольно прочно сорбировать на своей поверхности самые разные классы органических соединений, которые коренным образом меняют свойства его поверхности.

Особенно интересно и необычно поведение силикагеля в водосодержащих элюентах. Долгое время этот вариант хроматографии считался бесперспективным за счет "дезактивирования" поверхности сорбента. Действительно, при хроматографировании на силикагеле большинства соединений в системе метанол-вода и ацетонитрил-вода не удавалось добиться приемлемого удерживания сорбатов. Затем в литературе появились описания успешных разделений на силикагеле некоторых классов соединений с использованием типичных ОФ-элюентов (в частности,

низкомолекулярных пептидов), причем отмечалось, что разделение проходит быстрее и качественнее, чем на ОДС-сорбентах [3].

Рис.7 как раз иллюстрирует пример такого разделения. Следует отметить, что, исходя из приведенного для элюента соотношения концентраций буфера и ацетонитрила, в данном случае авторы, видимо, сами того не подозревая, вошли в довольно специфический режим динамического модифицирования силикагеля - динамически индуцированный раздел фаз, который подробнее будет рассмотрен в разделе 2.4.

Таким образом, следует признать, что без специальных модифицирующих добавок в элюент, добиться удерживания и приемлемой формы пиков большинства сорбатов на силикагеле в обращенно-фазовых системах растворителей не удастся практически во всем диапазоне концентраций водно-органических смесей.

Дальнейшие эксперименты с динамическим модифицированием неизмененного силикагеля показали, что, используя, например, цетримид (бромид цетилтриметиламмония) можно в водных элюентах добиться такого же разделения, как и на С18. Причем, порядок выхода, удерживание и эффективность разделения были очень схожи с аналогичными параметрами для разделения на химически модифицированных силикагелях С18.

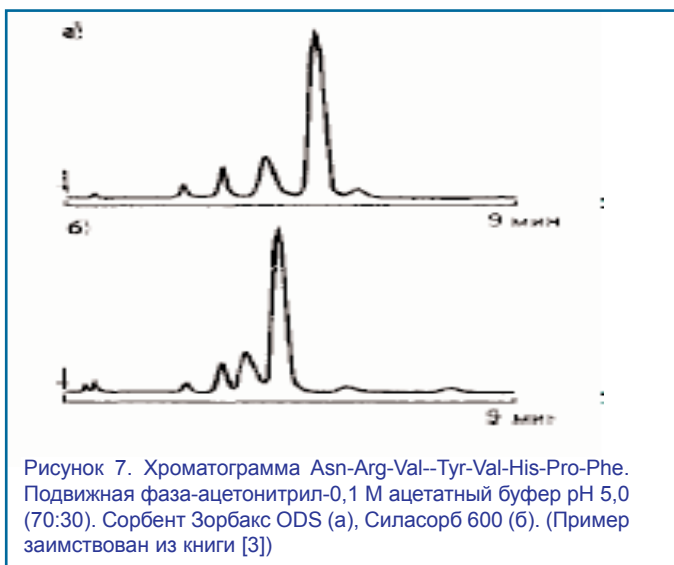


Рисунок 7. Хроматограмма Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe. Подвижная фаза-ацетонитрил-0,1 М ацетатный буфер pH 5,0 (70:30). Сорбент Зорбакс ODS (а), Силасорб 600 (б). (Пример заимствован из книги [3])

Этот прием очень удобен при анализе плохо очищенных образцов, так как, варьируя содержание модификатора в элюенте, можно в широких пределах изменять удерживание липофильных сорбатов. Кроме того, колонки с силикагелем почти вдвое дешевле и значительно легче регенерируются, чем колонки с химически привитой обращенной фазой.

Примером такого анализа на динамически эмулированной обращенной фазе является определение триклозана (антисептик) в мыле и зубной пасте (рис. 8).

Возможность динамически эмулировать на поверхности силикагеля обращенную фазу позволяет не только работать с гораздо более дешевыми и воспроизводимыми по свойствам колонками с силикагелем, но и, в перспективе, перенести отработанные в ОФ ВЭЖХ методики в практику ТСХ с несущественными изменениями. Кроме того, динамическое модифицирование позволяет формировать в процессе хроматографирования образца поверхность с практически любыми свойствами за счет использования динамического модифицирования силикагеля полифункциональными органическими соединениями. При изучении поведения силикагеля в обращеннофазных (содержащих воду) элюентах, в первую очередь логично было бы попробовать амины различной структуры и их производные. При введении добавок гидрофобных диаминов

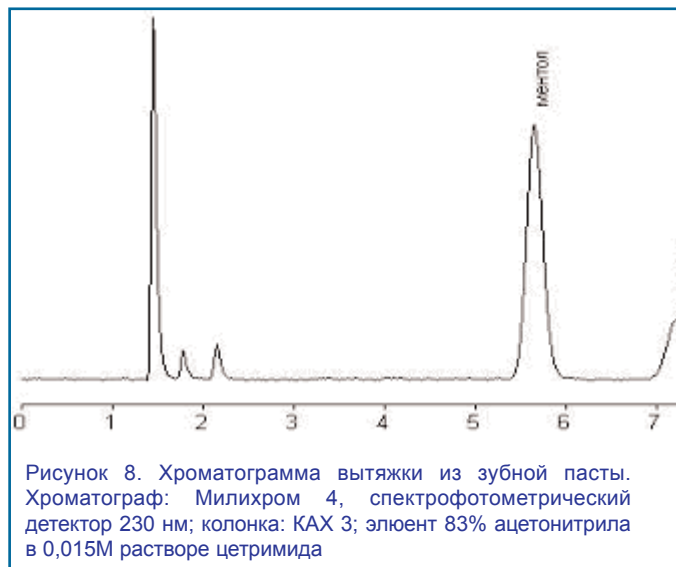


Рисунок 8. Хроматограмма вытяжки из зубной пасты. Хроматограф: Милихром 4, спектрофотометрический детектор 230 нм; колонка: КАХ 3; элюент 83% ацетонитрила в 0,015М растворе цетримид

в подвижную фазу, состоящую из воды и органического растворителя, силикагелю удалось придать свойства, характерные для аминоалкилсиликагелей [9]. Порядок элюирования углеводов на таком сорбенте свидетельствует о том, что кислые силанольные группы прочно сорбировали одну из аминогрупп, другая же, за счет стерических затруднений, в основном оставалась не занятой и обращенной наружу.

В качестве такого ДМ силикагеля неплохо зарекомендовал себя кадаверин (тетраметилендиамин). Кроме формирования аминфазы, представляющую собой слабый анионообменник, кадаверин вполне может участвовать в ассоциации с кислыми сорбатами, значительно повышая их липофильность. В этом варианте хорошо делятся дикарбоновые и трикарбоновые кислоты, причем при гораздо более мягком хроматографическом поведении, нежели в ион-парном варианте на обращенной фазе (рис. 9). Под мягкостью хроматографического поведения в данном случае понимается отсутствие резкой зависимости величины удерживания сорбата от состава элюента.

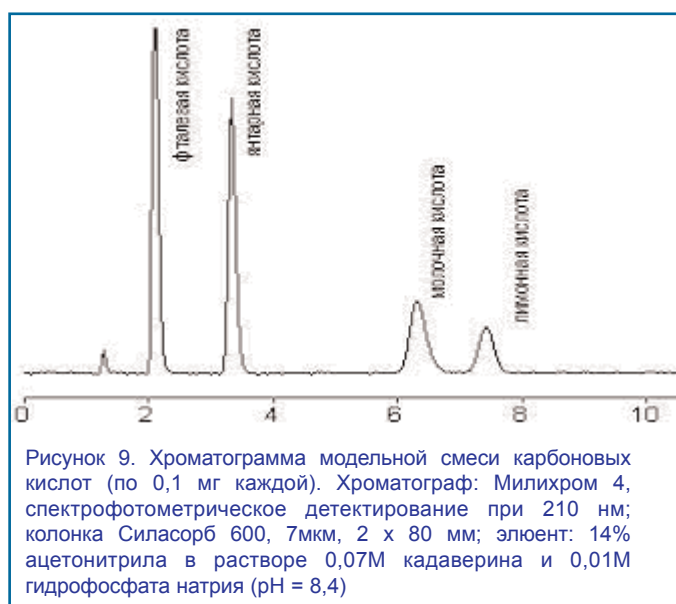


Рисунок 9. Хроматограмма модельной смеси карбоновых кислот (по 0,1 мг каждой). Хроматограф: Милихром 4, спектрофотометрическое детектирование при 210 нм; колонка Силасорб 600, 7мкм, 2 x 80 мм; элюент: 14% ацетонитрила в растворе 0,07М кадаверина и 0,01М гидрофосфата натрия (pH = 8,4)

Еще более интересные и разнообразные свойства поверхности силикагеля удалось получить при использовании в качестве модификатора бетаинов и триметилгидразиниевых производных короткоцепочных карбоновых кислот.



Эти вещества, будучи химически очень похожими на тетраалкиламмониевые соли, довольно прочно удерживаются на поверхности силикагеля именно аммонийной частью, а карбоксильная группа обращена наружу и имитирует слабый катионообменник. На таких системах хорошо разделяются многие органические основания, в том числе и алкалоиды [10]. Интересен тот факт, что подбором вида и длины углеродной цепи таких модификаторов, можно в широких пределах варьировать удержание катионогенных сорбатов, вплоть до имитации градиентного разделения при реализации изократического элюирования. Примером такого использования ДМ [11] является анализ пиридоксина (витамин В6) и полупродуктов его синтеза, разделение которых в других условиях было рассмотрено ранее.

Использование в качестве ДМ бромида метилового эфира 1,1,1-триметилгидразинийпропионовой кислоты позволило в изократическом режиме поделить очень разные по силе органические основания (рис. 10).

Из табл. 1 хорошо видно, что для каждого последующего пика эффективность колонки ощутимо увеличивается, что обычно наблюдается лишь при градиентном режиме элюирования. Причин этого может быть несколько, в частности, не исключено, например, проявление модификатором эффекта вытеснения сорбатов с поверхности сорбента, о котором уже говорилось. Немаловажно, что это разделение проходит без использования органических растворителей, тем не менее, при этом в руках хроматографа остается средство регулирования удерживания сорбатов. Снижение содержания модификатора в элюенте при этом режиме равнозначно уменьшению концентрации органического компонента элюента в ОФ ВЭЖХ.

Увеличение качества разделения, сокращение времени и удешевление всей процедуры хроматографического анализа столь очевидны, что может оказаться выгоднее заказать синтез небольших количеств этих соединений, чем подбирать и комбинировать режимы разделения на дорогостоящих колонках с химически модифицированным силикагелем.

Дополнительно к этому, при динамическом модифицировании силикагеля можно организовывать временной градиент концентрации модификатора в элюенте и, переходя из распределительного механизма в ионообменный (или - наоборот), на протяжении элюирования, успешно делить кислые, основные и нейтральные сорбаты одновременно из одной пробы.

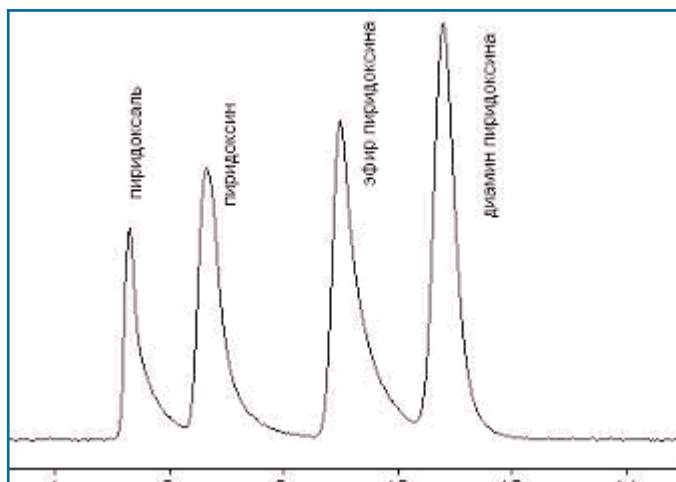


Рисунок 10. Хроматограмма витамина В6 и полупродуктов его синтеза на силикагеле в режиме динамического модифицирования. Хроматограф: Милихром 4, УФ детектирование при 290 нм; колонка: КАХ 3, заполненная Силасорбом 600; Элюент: 0,02М дигидрофосфата калия и 0,1М бромида триметилгидразинийметилпропионата в воде pH=6

Таблица 1. Высоты, эквивалентные теоретической тарелке (ВЭТТ) для пиков компонентов на рис. 10.

Вещество	ВЭТТ, мкм
Пиридоксаль	108
Пиридоксин	82
Эфир пиридоксина	42
Диамин пиридоксина	32

В плане перехода на водно-органические элюенты при работе на силикагеле интересно и перспективно использование добавок солей органических и неорганических кислот. Эта разновидность хроматографии активно используется в последние несколько лет и даже получила название гидрофильная хроматография (HILIC-chromatography).

Этот режим позволяет хроматографировать высокополярные вещества преимущественно основного характера и используется чаще в системах ВЭЖХ-МС, когда использование хроматографических режимов с ион-парными реагентами недопустим, поскольку нарушает работу детектора. Как правило, качество разделения в этом режиме не лучше, чем при использовании алкилсиликагелей с ион-парными модификаторами.

Безусловно, наличие у аналитика еще, как минимум, одной степени свободы при проведении хроматографического разделения, значительно упрощает подбор оптимальных условий и позволяет более целенаправленно бороться с не основными механизмами сорбции и искажениями формы пиков.

Кроме описанных, существуют и другие виды динамического модифицирования, некоторые из которых выделены даже в самостоятельный вид ВЭЖХ. В частности, лигандообменная хроматография, впервые предложенная В.А.Даванковым, также иногда основана на динамическом модифицировании\*\*. В настоящее время она является наиболее селективным средством разделения оптических изомеров. Основы этого специфического хроматографического метода и его возможности достаточно подробно изложены в [12] и последующих работах на эту тему, поэтому в рамках данной главы мы не будем останавливаться на лигандообменной хроматографии.

Фантазия хроматографистов в плане поиска модифицирующих добавок в элюент поистине неисчерпаема. В работе [13] в качестве динамических модификаторов при хроматографии аминов были, например, использованы такие экзотические соединения, как краун-эфиры. Их введение в хроматографическую систему (0,01-0,05 моль/л) увеличивало удержание аминов и аминокислот и практически не влияло на коэффициенты емкости нейтральных сорбатов. Причины такого необычного воздействия на хроматографическую систему авторами не обсуждаются\*\*\*.

Перечисленные в данном разделе примеры и варианты динамического модифицирования далеко не исчерпывают всего разнообразия новых сорбционных свойств, которые этим способом можно придать традиционным сорбентам. В то же время они убеждают в том, что возможности регулирования селективности разделения на относительно небольшом ассортименте обычных сорбентов могут быть значительно расширены с помощью этого простого и доступного метода.

#### Динамическое модифицирование в граничных условиях

Немаловажным фактором при ДМ является выбор концентрации модифицирующего агента. В некоторой области концентраций изменение свойств хроматографической системы происходит пропорционально количеству присутствующего в элюенте модификатора. Однако, начиная с некоторой концентрации, происходит довольно резкое качественное изменение воздействия

модификатора на систему. Это справедливо практически для всех видов ДМ.

Так, например, повышение содержания в элюенте ПАВ при реализации ион-парного механизма ОФ ВЭЖХ до уровня критической концентрации мицеллообразования (ККМ) (для разных ПАВ 0,005 - 0,1 М) и выше, выводит хроматографическое разделение в мицеллярный режим, который, в отличие от ион-парного, характеризуется значительным падением удерживания ионогенных соединений в колонке и уменьшением емкости сорбента к этим веществам [3]. Неионогенные вещества при этом также значительно меняют свое хроматографическое поведение.

Этот режим ДМ появился сравнительно недавно (начало 80-х годов прошлого века), но уже достаточно хорошо изучен. Ему, в частности, посвящен довольно обстоятельный обзор [14], поэтому ограничимся лишь кратким изложением особенностей мицеллярной ВЭЖХ.

Следует отметить, что этот вид динамического модифицирования используется почти исключительно в обращенно-фазовом режиме ВЭЖХ, что, видимо, связано со сложным характером взаимодействия ПАВ с поверхностью силикагеля, особенно в неводных растворителях.

Механизм сорбции в этом режиме хроматографии большинство исследователей объясняют образованием многослойных коллоидных конгломератов - мицелл, состоящих из радиально ориентированных молекул сорбата и ПАВ. Часто наружная оболочка мицеллы имеет ярко выраженный полярный характер, что наряду со стерическими затруднениями взаимодействия мицеллы с поверхностью узких пор, приводит к аномально низкому удерживанию ионогенных веществ в колонке. Он позволяет в некоторых случаях добиться выхода целевых веществ в чистой от примесей области хроматограммы и, таким образом, снизить требования к качеству пробоподготовки [15].

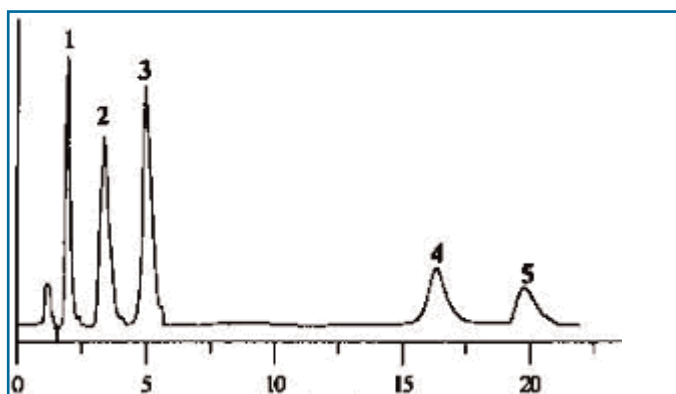


Рисунок 11. Хроматограмма водорастворимых витаминов в режиме мицеллярной хроматографии.

Колонка: 4 x 150 мм, Гиперсил ODS 4мкм; Элюент: 4% 1-пентанола в 0,1М растворе SDS (додецилсульфат натрия), pH=3; УФ детектирование 230 нм. 1 - рибофлавин; 2 - никотинамид; 3 - пиридоксин; 4 - пиридоксамин; 5 - тиамин (хроматограмма приведена из [16])

Именно эта особенность мицеллярной ВЭЖХ сделало ее необычайно популярной при анализе лекарственных препаратов и биологических жидкостей.

К отрицательным особенностям мицеллярного режима хроматографии следует отнести некоторое снижение эффективности и сложность регулирования селективности разделения и удерживания сорбатов, обусловленную замедлением установления равновесия в трехфазных системах и многообразием конкурентных процессов, протекающих в колонке. Некоторые хлопоты хроматографисту может доставить и склонность элюентов со значительным содержанием ПАВ к пенообразованию, что особенно актуально при проведении их вакуумной дегазации. При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ, в том числе

и неионогенных, мицеллы могут преобразоваться в липосомы (псевдофлюкулярные образования), которые, в зависимости от их структуры, могут либо вообще не удерживаться в колонке, либо могут задерживаться уже начальными участками сорбента и при данных условиях анализа не выходить из колонки.

Интересен еще один аспект применения мицеллярного режима - отмывка обращенно-фазовых колонок от прочно сорбированных примесей. Привлечение этого режима иногда позволяет спасти колонку, сильно загрязненную, например, белками и липидами, даже если промывка ее смесями растворителей не дала результата. Правда, после этого уже проблематично отмыть сами ПАВ от сорбента, но в некоторых экстремальных условиях важнее восстановить работоспособность колонки, нежели заботиться о некотором изменении селективности сорбента.

Другой пример, когда повышение концентрации модификатора приводит в конечном итоге к резкому качественному изменению свойств хроматографической системы это использование добавок в элюент неорганических солей.

Если в большинстве случаев механизм воздействия относительно высоких концентраций большинства модификаторов на хроматографическую систему вполне очевиден, то использование в качестве элюента водно-органических растворов неорганических солей, при их значительном содержании, приводит иногда к парадоксальным эффектам.

Особенно это ярко проявляется в элюентах, где в качестве органического компонента используется ацетонитрил. Дело в том, что ацетонитрил и, например, метанол ведут себя в относительно концентрированных растворах неорганических солей по-разному. И в том, и в другом случае при достижении некоторой предельной концентрации соли в элюенте, начинается его гетерогенизация. И, если в случае метанола, имеющего наибольшее из всех органических растворителей сродство к воде, происходит выпадение осадка избыточной соли, то ацетонитрил, наоборот, просто высаливается из элюента, всплывая на поверхность. При этом образуются две жидкие несмешивающиеся фазы: нижняя, содержащая, в основном, воду и соль, и верхняя - водный раствор, предельно обогащенный ацетонитрилом, практически не содержащий гидратированных ионов соли. В табл. 2 приведены экспериментально найденные предельные концентрации ацетонитрила при фиксированных содержаниях дигидрофосфата калия, выше которых происходит гетерогенизация элюента.

Следует отметить, что в зависимости от химической природы применяемой соли, гетерогенизация элюента начинается при различных концентрациях ацетонитрила. Наряду с дигидрофосфатами калия и натрия в этом качестве могут применяться перхлораты лития, магния и аммония, а также ацетаты и ряд других солей. Основным критерием выбора соли, как правило, является хорошая растворимость

Таблица 2. Максимальное (до гетерогенизации) содержание ацетонитрила в элюенте в зависимости от концентрации дигидрофосфата калия при 20°C.

Концентрация дигидрофосфата калия, М	Содержание ацетонитрила, об. %
0.01	95.8
0.05	84.3
0.10	75.4
0.20	66.0
0.25	58.7
0.30	53.1
0.50	40.0
0.70	35.7

ее в водно-органических системах и прозрачность этих растворов в УФ диапазоне. По этой причине нежелательно применение, например, бромидов и нитратов. Концентрационный порог расслоения элюента также существенно зависит от температуры и значительно в меньшей степени - от pH.

Кроме ацетонитрила, такое поведение в смесях с водой характерно для многих других апротонных растворителей, в частности, для кетонов, сложных и простых эфиров, алкиламидов низкомолекулярных карбоновых кислот. Однако, учитывая, что в практике ВЭЖХ наибольшее распространение получило использование именно ацетонитрила, в дальнейшем будем рассматривать преимущественно этот растворитель.

Хорошо известно, что добавка неорганической соли в элюент при реализации ОФ режима хроматографии способствует увеличению удерживания полярных и, особенно, ионогенных органических веществ [4]. Причиной этому, видимо, является совместное и синбатное действие нескольких факторов.

Во-первых, - это увеличение ионной силы раствора, препятствующее диссоциации кислот и протонизации оснований, что неизбежно увеличивает их липофильность.

Во-вторых, наличие неорганической соли значительно меняет условия сольватации, в частности, - гидратации молекул сорбата, что не может не сказаться на прочности водородных связей в ассоциатах полярных молекул и их липофильности. Конкуренция за включение воды в сольватную оболочку между ионами заканчивается в пользу неорганических, ввиду присущей им энергии гидратации, значительно превосходящей таковую для органических ионов. А это, в свою очередь, приводит к снижению доли воды в сольватной оболочке сорбатов и увеличению их липофильности.

И, наконец, действует элементарный эффект высаливания из редных растворов менее полярных, чем ионы соли веществ, что коренным образом меняет коэффициент распределения анализируемого вещества в системе жидкостей элюент - НЖФ. При этом приповерхностный слой элюента обедняется, а поверхность сорбента обогащается органическим компонентом элюента. Полярность НЖФ возрастает, а значит, увеличивается растворимость в ней полярных сорбатов.

Причем, совсем не обязательно, чтобы концентрация соли превышала уровень расслоения элюента. Уже при концентрации соли в элюенте 70 - 80% от уровня его гетерогенизации, расслоение за счет капиллярного эффекта происходит на поверхности основных пор сорбента, а в более мелких порах оно начинается еще при более низких концентрациях.

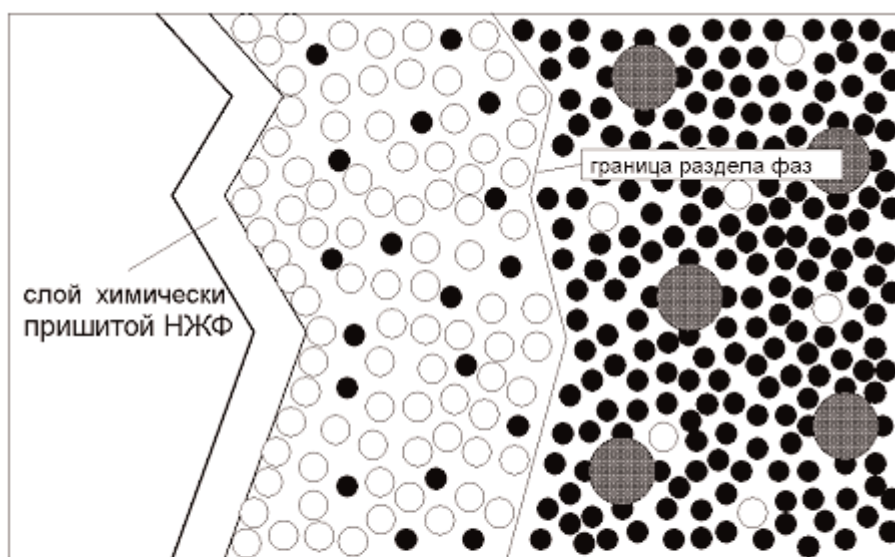
Удерживание полярных сорбатов возрастает настолько, что уже нет нужды прибегать к ион-парному варианту динамического модифицирования обращенной фазы [17]. На рис. 13 приведен пример разделения водорастворимых витаминов, которые, в большинстве своем, являются органическими основаниями.

Хорошая разделительная способность и емкость сорбента по отношению к высокомолекулярным веществам позволяет в этом режиме хроматографии получить довольно симметричный и узкий пик витамина В12 (цианкобаламин), который, как правило, при разделении водорастворимых витаминов в ион-парном варианте очень критичен к качеству сорбента и зачастую просто не выходит из колонки за приемлемое время в виде интерпретируемого пика.

Такой граничный режим динамического модифицирования хроматографической системы логично было бы назвать "динамически индуцированным разделом фаз" (ДИРФ), поскольку реализуется вариант хроматографии на разделе фаз двух несмешивающихся жидкостей, образованном при взаимно опосредованном воздействии на поверхность сорбента компонентов элюента. В дальнейшем будем пользоваться этим нововведенным термином, как для обозначения описанного механизма хроматографического разделения, так и для названия методического приема в ВЭЖХ.

Следует отметить, что для осуществления индуцированного раздела фаз подойдет силикагели и с другими химически пришитыми фазами, такими как нитрил, амин или диол. Соответственно хроматографические свойства таких систем будут существенно отличаться от аналогичных свойств систем на основе силикагеля С18.

При работе в режиме НФ (на неизменных силикагелях), но с использованием водосодержащих элюентов, добавка соли в элюент также приводит к динамически индуцированному разделу фаз, но у поверхности сорбента остается пленка жидкости, содержащая



-  - ион соли
-  - молекула воды
-  - молекула ацетонитрила

Рисунок 12. Упрощенная схема формирования динамически индуцированного раздела фаз на поверхности ODS-силикагеля

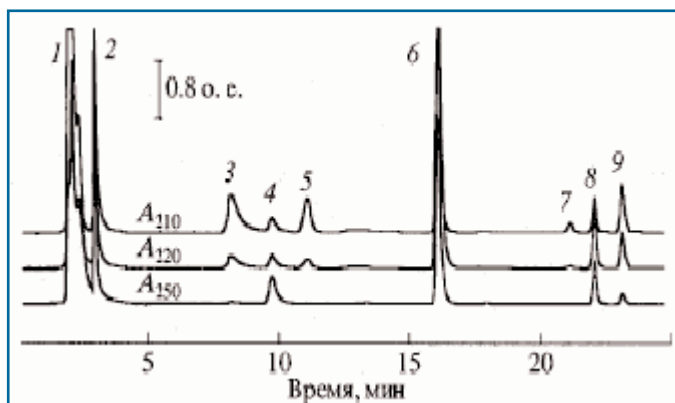


Рисунок 13. Хроматограмма разделения стандартной смеси водорастворимых витаминов. Хроматограф: Милихром А-02; Колонка: Нуклеосил 100-5 С18, градиент от 2% (8 мин - изократика) до 18% ацетонитрила в 0,4М растворе перхлората лития. 1- растворитель, 2 - никотиновая кислота, 3 - B6, 4 - B1, 5 - пантотеновая кислота, 6 - K3, 7 - биотин, 8 - B2, 9 - B12. (хроматограмма приводится из статьи [17])

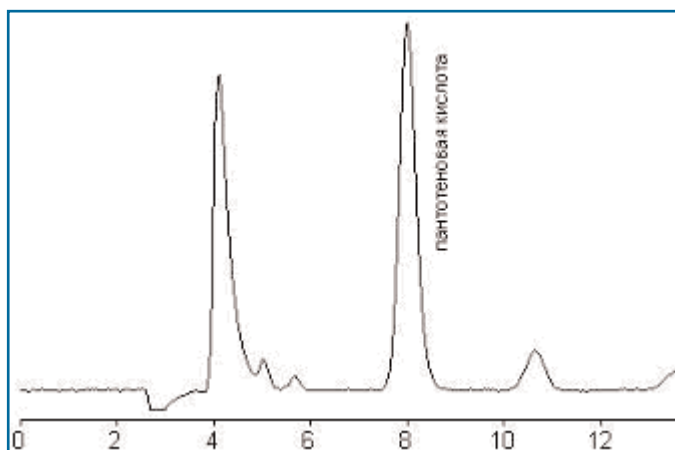


Рисунок 14. Хроматограмма технологического раствора, содержащего пантотенат кальция. Хроматограф: Милихром 4, УФ детектирование 210 нм; Колонка: КАХ 3 с Силасорбом 600; элюент: 80% ацетонитрила в 0,05М растворе дигидрофосфата калия, pH=5

более значительную концентрацию воды и гидратированных ионов соли, чем находится в элюенте. То есть, раздел фаз протекает по такой же схеме, что и на химически модифицированном силикагеле, но все процессы инвертированы. Режим разделения также остается нормальнофазовым, но все, что касается удерживания и скорости установления межфазного концентрационного равновесия претерпевает те же изменения, как и в случае обращеннофазового варианта. Этот вариант можно рассматривать как граничный режим гидрофильной хроматографии (HILIC-режим), о котором упоминалось ранее. Этот режим на обычном силикагеле имеет наибольший потенциал, так как идеально приспособлен для разделения высокополярных веществ, как кислого, так и основного характера, анализ которых традиционно сложен при использовании других режимов ВЭЖХ.

Так, типичный кислый сорбат - витамин B3 (пантотеновая кислота) выходит в режиме ДИРФ симметричным пиком независимо от его концентрации в пробе (рис. 14) [18]

И только в нормально-фазовом варианте ДИРФ удалось, например, проанализировать ряд бетаинов в плазме крови [19], (рис. 15). В других условиях они практически не удерживаются в колонке. Для обеспечения экспрессности

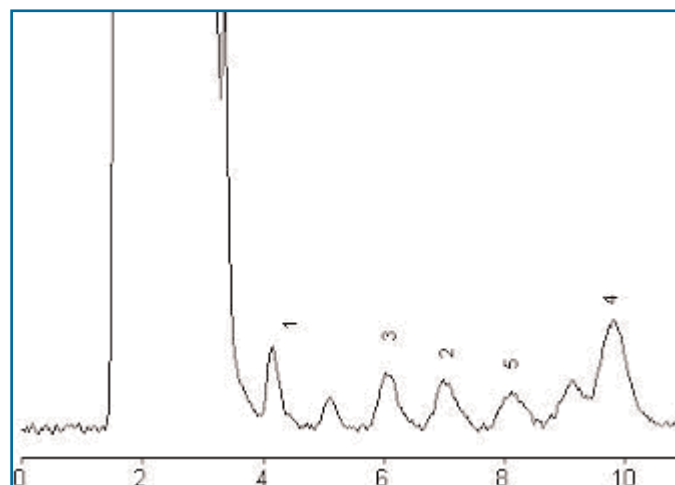


Рисунок 15. Хроматограмма плазмы крови на дифильном сорбенте в режиме НФ ДИРФ.

Хроматограф: Gilson, УФ детектирование 195 нм, Колонка: 4x250 мм с Zorbax Sil 5 мкм, химически модифицированным альбумином. Элюент: градиент 72% ацетонитрила в 0,26М фосфатном буфере, pH=6,3. 1 - глицинбетаин, 2 - б- аланин-бетаин, 3 - г-треонин-бетаин (карнитин), 4 - бетаин г-аминоасляной кислоты, 5 - милдронат

анализа биологических проб и исключения потерь целевых веществ при пробоподготовке, специально для осуществления этого разделения А.А.Серданом был разработан и изготовлен дифильный (гетероповерхностный) сорбент, поверхность крупных пор которого была покрыта химически пришитым альбумином, а мелкие поры оставались немодифицированными. При использовании колонки с таким сорбентом из пробы крови объемом всего 0,3 мл. удалось за 30 мин провести анализ четырех природных бетаинов и лекарственного препарата под торговым названием "милдронат" (кардиопротектор), который представляет собой внутреннюю соль 1,1,1-триметилгидразинийпропионат. Учитывая, что бетаины почти не поглощают в УФ, а в плазме крови содержатся в очень небольших количествах (30 - 500 мкг/л), УФ-детектирование пришлось проводить при 195 нм. Это удалось сделать только благодаря тому, что элюент, использованный для поддержания режима ДИРФ, не содержал поглощающих в УФ компонентов. В настоящее время, при все более широком распространении систем ВЭЖХ-МС (масс-спектрометрическое детектирование), стало возможным еще больше увеличить чувствительность детектирования подобных соединений.

В аналогичном режиме можно провести и разделение некоторых свободных (нативных) аминокислот в неочищенных биологических жидкостях.

Хроматография с ДИРФ значительно упрощает разделение и высокомолекулярных компонентов. На рис. 16 приведена хроматограмма пчелиного яда, содержащего высокомолекулярные пептиды с молекулярной массой от 2000 до 30000. В данном случае следует отметить высокую живучесть колонки в режиме ДИРФ, учитывая, что в хроматограф вводился неочищенный (только профильтрованный) раствор пчелиного яда. Ресурса колонки без регенерации и потери делящей способности хватает более чем на 1800 анализов. Что интересно, перенос этого режима в препаративный вариант ВЭЖХ не только позволил провести за один проход качественное выделение практически любого из компонентов яда, но и достичь загрузки полупрепаративной колонки размером 9,4x150мм в 3,5г яда на ввод, чего довольно проблематично добиться в других хроматографических режимах.

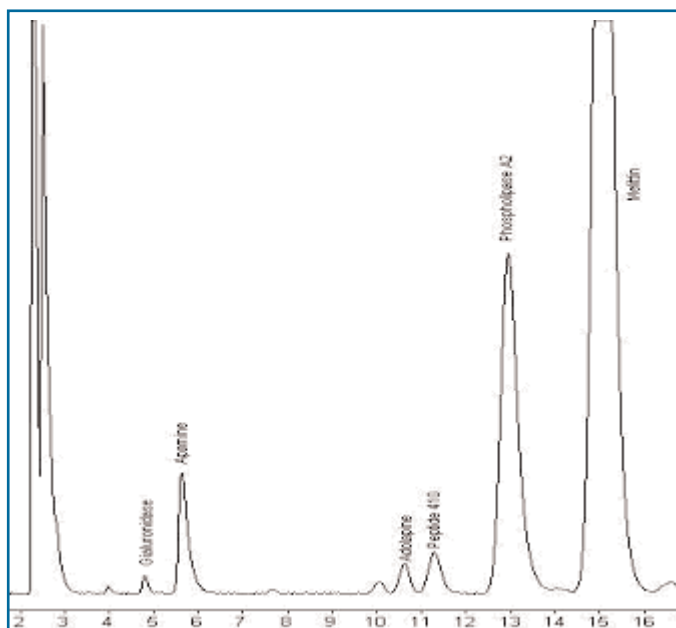


Рисунок 16. Хроматограмма пчелиного яда в режиме ДИРФ. Хроматограф: Милихром 4, УФ детектирование 210 нм; колонка: 2 x 80 мм, Сепарон SGX, 5мкм; градиент 20 - 50% ацетонитрила в 0,37M растворе дигидрофосфата калия

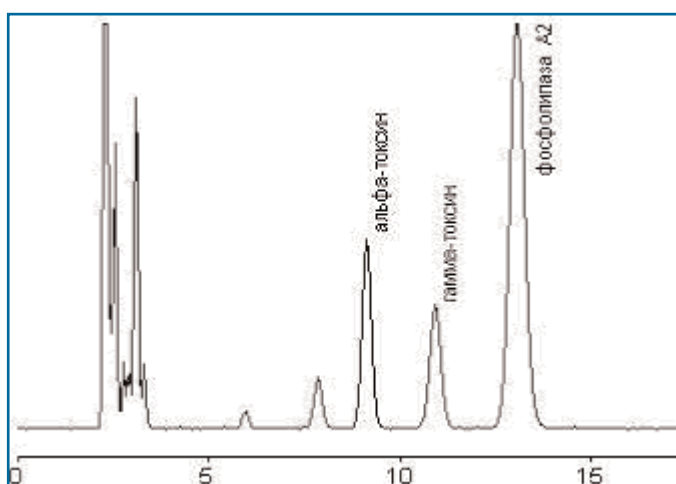


Рисунок 17. Хроматограмма яда кавказской степной гадюки. Хроматограф: Милихром 4, УФ детектирование 220 нм; колонка: 2 x 120 мм, Сепарон SGX, 5мкм; элюент: 32% ацетонитрила и 2,5% метанола в 0,35M растворе дигидрофосфата калия

Особенностью ДИРФ является очень высокая чувствительность к изменению концентрации ацетонитрила в элюенте. Коэффициенты емкости отдельных соединений могут измениться в несколько раз при изменении концентрации ацетонитрила всего на несколько процентов. В некоторых случаях это может создавать определенные проблемы, так как в этой ситуации трудно ожидать хорошей воспроизводимости времен удерживания сорбатов, но путем несложных технических решений эта проблема устранима, если не полностью, то в значительной мере.

В этом же плане стоит отметить значительную чувствительность этого режима к различиям свойств поверхности и структуры применяемых силикагелей, что, впрочем, нельзя однозначно отнести к отрицательным качествам ДИРФ.

К недостаткам режима ДИРФ можно отнести и

существенное снижение эффективности колонки по сравнению с паспортной, что вполне объяснимо увеличением толщины слоя НЖФ, образующейся при разделе фаз в порах сорбента. Тем не менее, с этим есть смысл мириться, учитывая очевидные преимущества ДИРФ и то, что анализы, для которых оптимален этот режим, в других вариантах ВЭЖХ зачастую дают еще большее снижение эффективности по причине сорбции преимущественно по ионообменному механизму и значительной асимметрии пиков.

Следует особо подчеркнуть, что метанол ведет себя в солевых растворах совершенно иначе, чем ацетонитрил и мало пригоден для реализации хроматографии с динамически индуцированным разделом фаз, как на прямой, так и на обратной фазе. Тем не менее, добавка метанола в элюент на уровне 3 - 7 % от количества ацетонитрила, позволяет заметно повысить эффективность разделения и несколько смягчить слишком крутую зависимость удерживания сорбатов от концентрации ацетонитрила. Аналогичное действие наблюдается, если вместо метанола взять глицерин или этиленгликоль. Такой эффект добавки связан, видимо, с уменьшением толщины слоя НЖФ при разделе фаз на поверхности сорбента, однако, нельзя исключить и более сложного воздействия спиртов на механизм разделения. На рис. 17 приведен пример разделения в режиме ДИРФ с дополнительной модификацией элюента метанолом. Примечательно, что молекулярная масса некоторых разделенных компонентов змеиного яда превышает 50 000.

Анализ полярных веществ в режиме ДИРФ особенно выгоден, по сравнению, например, с ион-парным режимом в случае, если матрица содержит много липофильных веществ. Они в режиме ДИРФ практически не удерживаются и выходят сразу за мертвым объемом. Таким образом, можно значительно снизить требования к очистке образца и, соответственно, сократить затраты времени и средств на пробоподготовку. Это, наряду с общим повышением экспрессности анализа, позволяет снизить потери целевых веществ до стадии хроматографирования образца, а значит - точность и воспроизводимость всей методики анализа.

#### Методология изучения хроматографических систем с динамическим модифицированием

Динамическое модифицирование, в зависимости от природы и концентрации применяемого реагента может воздействовать очень слабо, почти не меняя вид хроматограммы, а может кардинально изменить механизм и эффективность разделения сорбатов, причем не всегда в лучшую сторону.

Для правильного выбора динамического модификатора из всего многообразия используемых для этих целей веществ, нужно в первую очередь хотя бы в первом приближении представлять себе процессы, идущие на поверхности сорбента в присутствии модификатора и без него, ориентироваться в химических свойствах всех участвующих в хроматографическом разделении компонентов элюента и анализируемой пробы.

В частности, при работе с использованием ДМ, в колонке практически всегда реализуется несколько различных механизмов разделения, что, при неправильном выборе модифицирующего агента, может весьма неблагоприятно сказаться на эффективности разделения некоторых аналитов. По этой причине подбор условий модифицирования должен опираться на основной критерий - обеспечение протекания одного преобладающего механизма разделения, желательно - распределительного, характеризующегося наиболее линейной изотермой сорбции и высокой скоростью установления межфазного равновесия.

К сожалению, если среди хроматографистов нет единого взгляда на процесс и механизм разделения в немодифицированных хроматографических системах, то

большинство разновидностей динамического модифицирования пока и вовсе остается без какого бы то ни было теоретического обеспечения. До сих пор подход к этому важному и перспективному методическому приему чаще всего имеет сугубо эмпирический характер.

Нельзя сказать, что этот весьма эффективный и недорогой методический прием корректировки условий хроматографического разделения не получил широкого распространения. Наоборот, в большинстве описанных в научной и нормативно-методической литературе хроматографических разделений в том или ином виде присутствует динамическое модифицирование. Но авторы обычно не задаются вопросом о механизме и закономерностях действия применяемых ими добавок и практически не обсуждают этот вопрос в своих публикациях. На основании изложенного в предыдущих разделах можно попытаться классифицировать виды ДМ сообразно целям и возможным механизмам сорбции. (см. таблицу 3).

К сожалению провести более детальную классификацию не представляется возможным, так как некоторые модификаторы даже невозможно классифицировать в ту или иную группу, поскольку механизм их действия не известен даже в первом приближении.

Просто из личного опыта оператор знает, что если добавить в элюент то или иное вещество в некотором диапазоне концентраций, то улучшится какой-либо параметр разделения или симметрия пика. Чаще всего, такие добавки используют прикладники, то есть люди, далекие от хромато-

графии и использующие ее как инструмент для получения некоей информации об объекте. При этом они даже не задумываются о происходящих в хроматографической колонке процессах. Это в принципе и правильно, так как механизм действия многих модификаторов настолько сложен и даже парадоксален, что зачастую априори предсказать его воздействие на хроматографическую систему просто невозможно.

Некоторые хроматографисты, особенно начинающие, даже не догадываются, что, экспериментально подобрав состав довольно сложного элюента для решения какой-либо хроматографической задачи, они используют в его составе динамический модификатор, и может даже не один. И только малая часть хроматографических методик разработана при осознанном и целенаправленном применении динамического модифицирования, как методического приема.

Для выявления хотя бы основных закономерностей того или иного вида динамического модифицирования, открытых, как правило, случайно, необходимо спланировать и провести целый ряд экспериментов, начиная с изучения поведения тестовых сорбатов в модифицированной системе и выяснения влияния концентрации компонентов элюента на процесс разделения. К сожалению, единая методология изучения хроматографических систем пока не разработана, исследователи действуют вразнобой, следуя по ситуации. Хотя этот момент, как и тестирование начальных свойств сорбентов, требует хотя бы частичной формализации.

Сорбент	Модификатор	Элюент	Цель	Граничный режим
Силикагель	Органические кислоты	НФ	Улучшение формы пика кислот сорбатов	-
	Амины	НФ	Улучшение формы пика органических оснований	-
	Цетримид	ОФ	Эмулирование алкильной фазы C16	-
	Кадаверин	ОФ	Эмулирование аминокислотной фазы	-
	Бетаины	ОФ	Эмулирование карбокси фазы	-
	Пентаэритрит	ОФ	Эмулирование диольной фазы	-
	Неорганические соли	ОФ	HILIC - режим разделения полярных сорбатов	ДИРФ - режим разделения полярных сорбатов и ВМС
	Специфические	НФ ОФ	Специальные задачи	Возможен
Силикагель с привитыми фазами (амино-, -нитрил, -диол)	Амины, кислоты	НФ	Аналогично силикагелю	-
	Амины, кислоты	ОФ	Аналогично алкилсиликагелю	-
	Неорганические соли	ОФ	Аналогично алкилсиликагелю	ДИРФ - режим
Алкил-силикагель	Буферные системы	ОФ	Стабилизация липофильности ионогенных веществ	-
	Соли тетраалкил-аммония	ОФ	Ион-парный режим разделения органических кислот	Мицеллярный режим
	Алкилсульфонаты	ОФ	Ион-парный режим разделения органических оснований	Мицеллярный режим
	Цетримид	Водные растворы солей	Эмулирование анионообменного режима	Мицеллярный режим
	Цетилсульфонат	Водные растворы солей	Эмулирование катионообменного режима	Мицеллярный режим
	Кислоты	ОФ	Улучшение формы пика органических кислот	-
	Амины	ОФ	Улучшение формы пика органических оснований	-
	Неорганические соли	ОФ	Улучшение формы пика и удерживания полярных сорбатов	ДИРФ - режим
Специфические	ОФ	Лигандообменный режим, специальные задачи	Возможен	

В этом случае значительно расширились бы возможности по использованию хроматографических методов, например, в составе утвержденных методик. По ним работают на приборах, в лучшем случае, квалифицированные операторы, от которых сложно (да и неправильно) ожидать незаурядного творчества при постановке хроматографической методики.

Особенно это актуально для ВЭЖХ-методик анализа продуктов питания, лекарственных препаратов и клинико-диагностических исследований, где необходимо определять весьма незначительные концентрации целевых аналитов на фоне аномально сложных матриц силами персонала, зачастую не имеющего даже химического образования. В ряде случаев, затратив немало средств на приобретение оборудования, стажировку сотрудников и постановку интересующей их методики, лаборатории не могут выдавать надежные данные анализа, от которых порой зависит здоровье людей и даже их жизнь.

Такая ситуация порождает оправданное недоверие пользователей к ВЭЖХ, как к методу анализа и требует кардинально иного подхода от разработчиков методик к выпускаемому ими интеллектуальному продукту. Если повторяемость методики находится в полной зависимости от несущественных конструктивных нюансов оборудования, эффективности и селективности колонки, а также чистоты реактивов, думается, она не может претендовать на широкое внедрение в виде нормативной документации любого вида. Тем не менее, это случается довольно часто.

В качестве примера можно привести претендующую на получение статуса ГОСТа, ВЭЖХ-методику "Коньячные спирты и коньяки. Метод определения содержания ванилина, кониферилового и сиреневого альдегидов".

В методике предлагается разделять основные компоненты образца на колонке с нуклеосилом C18 в градиенте ацетонитрила в 2% водном растворе уксусной кислоты, которая, совершенно очевидно, выступает тут в роли динамического модификатора (рис. 18). Учитывая, что большинство сорбатов имеют кислый характер, то решение вполне логичное. Но при воспроизведении этой методики оказалось, что качество разделения очень сильно зависит от колебаний селективности сорбента, которое уже ощутимо различалось для двух сорбентов одной марки, но из разных партий. Кроме того, уже при падении эффективности колонки всего на 20%, уровень разделения отдельных компонентов оказывался неудовлетворительным.

При замене уксусной кислоты 0,05М фосфатным буфером (pH=3) с добавкой 0,5% пропионовой кислоты, удалось добиться значительного увеличения селективности разделения целевых веществ (рис. 19). При элюировании компонентов пробы применен близкий к линейному градиент ацетонитрила от 10% до 60%.

Можно не сомневаться, что если поэкспериментировать с другими вариантами динамического модифицирования и режимами разделения, наверняка можно будет получить еще более качественное разделение. Таким образом, изначально при разработке методики были достигнуты минимально необходимые для разделения, но не

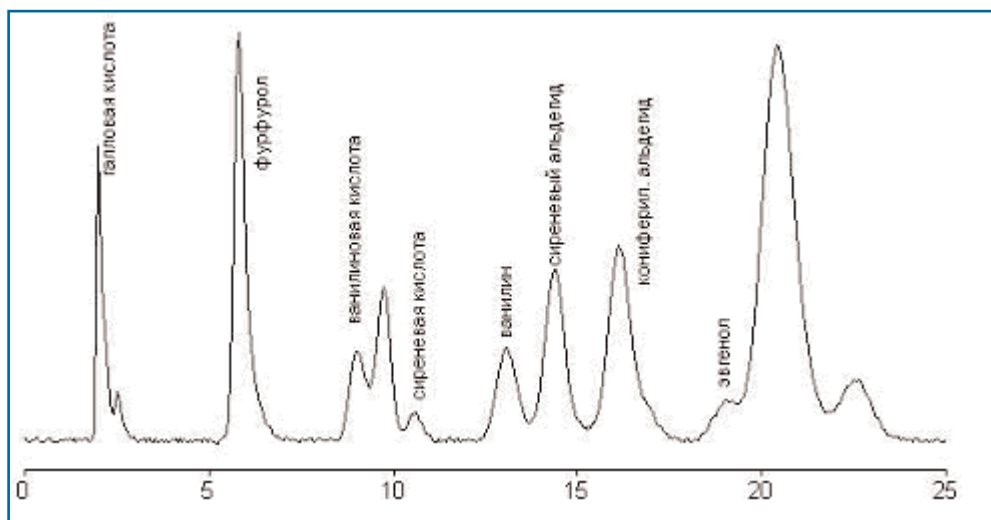


Рисунок 18. Хроматограмма коньячного спирта 20-летней выдержки.

Хроматограф: Милихром 4, УФ детектирование 280 нм; Колонка: 2x80 мм, Нуклеосил C18, 6 мкм.

Градиент ацетонитрила от 5 до 70% в 2%-ом растворе уксусной кислоты

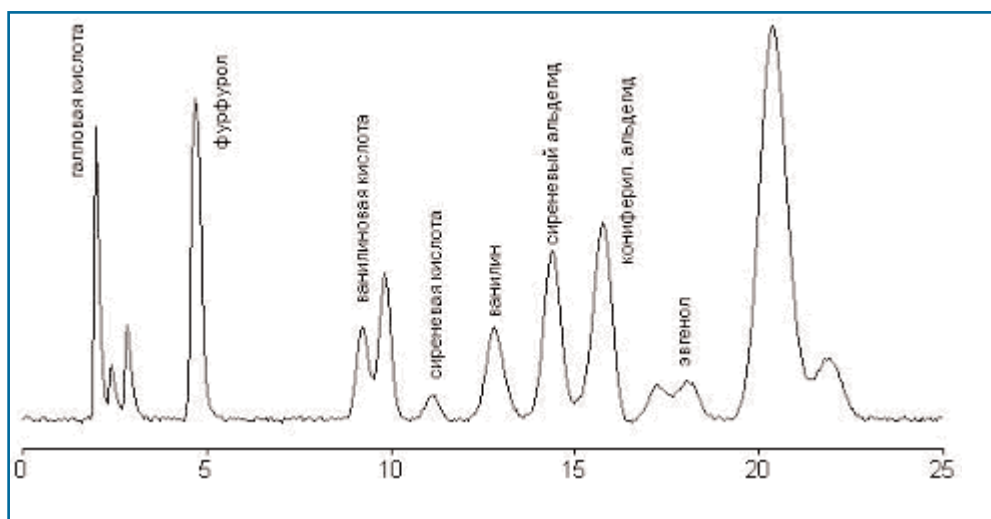


Рисунок 19. Хроматограмма коньячного спирта 20-летней выдержки.

Хроматограф: Милихром 4, УФ детектирование 280 нм; Колонка: 2x80 мм, Нуклеосил C18, 6 мкм.

Градиент ацетонитрила от 5 до 70% в 0,05М фосфатном буфере (pH=3) с добавкой 0,5% пропионовой кислоты

оптимальные свойства хроматографической системы. При этом следует отметить, что автор методики, будучи квалифицированным технологом-виноделом, а не хроматографистом, с честью вышел из положения при решении этой довольно непростой хроматографической задачи.

Тем не менее, довести решение задачи до логического конца не удалось, и всего лишь потому, что пока не существует единого и четкого подхода к динамическому модифицированию хроматографических систем даже на эмпирическом уровне. Недостаточно внимания обсуждению закономерностей, присущих различным вариантам динамического модифицирования, уделяется авторами публикаций в научной и методической литературе. Такое положение вещей не позволяет начинающим хроматографистам поближе познакомиться с этим полезным методическим приемом и в достаточной мере овладеть им.

Другим актуальным вопросом, где динамическое модифицирование может оказаться полезным, является развитие методов тестирования хроматографических систем и их составляющих.

В этом плане кажется довольно перспективным использование режима ДИРФ для получения, в частности, дополнительной информации о хроматографических сорбентах на основе силикагеля. Именно аномально высокая чувствительность этого режима к структуре и свойствам поверхности силикагеля может стать основой для привлечения этого методического приема в арсенал средств и методов изучения ВЭЖХ-сорбентов.

Как уже говорилось, за счет капиллярного эффекта раздел фаз солевого раствора элюента в мелких порах происходит при значительно более низких концентрациях ацетонитрила, чем гетерогенизация элюента в макропорах.

Таким образом, построив зависимость коэффициентов емкости специально подобранных высокополярных тестовых сорбатов от содержания соли в элюенте, получим кривую нелинейного вида. Можно предположить, что форма этой кривой, напрямую зависит от количества и уровня стерической доступности определенного размера пор сорбента. Нужно только помнить, что гетерогенизация элюента сильно зависит от температуры, поэтому при организации такого эксперимента необходимо предусмотреть термостатирование колонки.

Для корректной обработки результатов такого тестирования колонок, при организации эксперимента обязательно нужно учесть или скомпенсировать ряд факторов, напрямую влияющих на удерживание веществ в колонке, а также разработать соответствующий математический аппарат на основе, например, моделирования процессов, преимущественно происходящих в колонке.

В частности, было бы интересно, как вариант, описать пористую структуру силикагелей в виде нерегулярных фракталов четырех порядков (по размеру) с указанием возможной доли участия каждого фрактала в изучаемом хроматографическом процессе.

Работа в этом направлении только начинается. Тем не менее, наличие еще одной поддающейся формализации характеристики хроматографической системы смогло бы значительно расширить наши представления о ВЭЖХ-сорбентах, а также о механизмах и закономерностях взаимодействия в системах сорбент-сорбат.

## Литература

1. Стыскин М.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е. В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. - М.: Химия, 1986. - 288с.
2. А.В.Киселев, Д.П.Пошкус, Я.И.Яшин. Молекулярные основы адсорбционной хроматографии. - М.: "Химия", 1986. 272 с.
3. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. /Рига:Зинатне.-1988.-390с.
4. Сычев С.Н. Методы совершенствования хроматографических систем и механизмы удерживания в ВЭЖХ: Монография.- Орел, 2000.- 212 с.

5. Сапрыкин Л.В., Киселева Н.В., Васильев В.Н. Хроматографический анализ витамина В6 и полупродуктов его синтеза. / Завод. Лаб. 1990. Т.56. №5. С. 16-18
6. Сапрыкин Л.В., Текуцкая Е.Е. Использование тонкослойной хроматографии для моделирования процесса экстракции веществ из водных растворов. Тезисы IV Всес. конф. молодых ученых по прикладной хроматографии, Дзюбга, 1991, с.23
7. Сычев С.Н. Статья на сайте <http://www.anchem.ru/journal/2003/0010-0015.asp>
8. Ghaemi Y., Wall R.A. Hydrophobic chromatography with dynamically coated stationary phases. /J/Chromatogr.-1979/-Vol.174, N1.-p.51-59
9. Boumahraz M., Davydov V.Y., Kiselev A.V. Separation of carbohydrates by liquid chromatography on silica gel adding adsorption modifiers to the eluent. /Chromatographia. - 1982/ - Vol. 15, N 11-12/ - P.751-756
10. Сапрыкин Л.В., Удалов А.В. Методические аспекты применения динамически модифицированных сорбентов для анализа биологических объектов с помощью ВЭЖХ. / Судебно-медицинская экспертиза, 1999, №4, С.24-27
11. Сапрыкин Л.В., Гусаров А.А., Киселева Н.В. Определение витамина В6 и полупродуктов его синтеза методами ВЭЖХ в ион-парном варианте и с применением модифицированного силикагеля. / Журнал аналитической химии, 1992, Т.47, №12, с.2066-2071.
12. Даванков В.А. Хроматография и оптическая изомерия. / Прикладная хроматография / Под ред. К.И.Сакодинского. - М. Наука, 1984. С.24-32
13. Nakagawa T., Mizinuma H., Shibukawa A., Uno T. Liquid chromatography with crown ether-containing mobile phases. 1. Capacity factors of amino compounds on a hydrophobic stationary phase. / J. Chromatogr. - 1981. - Vol. 211, N1, P.1-13.
14. Басова Е.М., Иванов В.М., Шпигун О.А. Мицеллярная жидкостная хроматография // Успехи химии. - 1999. - Т. 68, № 12. - С. 1083-1101.
15. Bragin O., Saprykin L., Kiseleva N. Determination of Toxins in Grain and Grain Products by High Efficiency Liquid Chromatography Method. / Ecol. Cong. Int. Jour., 1998, V.2, №4, p. 23-24
16. Monferrer-Pons L., Capella-Peiro M.E., Gil-Agusti M., Esteve-Romero J. // J.Chromatogr.A. - 2003. - Vol. 984. - P. 223-231.
17. Л.А.Кожанова, Г.А.Федорова, Г.И.Барам, Определение водо- и жирорастворимых витаминов в поливитаминных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. ЖАХ, 2002, т.57, №1, с.49-54
18. Гусаров А.А., Сапрыкин Л.В., Киселева Н.В. Методика определения пантотената кальция методом ВЭЖХ с применением нетрадиционного режима хроматографии на силикагеле, Завод. лаборатория, 1992, № 11, с.7-9
19. Gusarov A., Saprykin L., Kiseleva N., Kalvins I. HPLC Determination of Natural and Synthetic High-Polar Polifunctional Organic Compounds in Biological Samples. / 8th Conf. of young scientists on organic and bioorganic chemistry. Riga, 1991, p.234

## Примечания редактора

\*) В настоящее время силикагель и полярные фазы на его основе имеют абсолютно одинаковую стоимость. Так что в плане симулирования стандартных amino- и диол- фаз метод ДМ уже практически не применяется. Что, правда, совершенно не уменьшает его преимуществ в других, специальных приложениях. Кроме того, по моему личному мнению, хроматографист-практик хотя бы раз в жизни должен сам сравнить химически и динамически модифицированные фазы, - для приобретения опыта. Все-таки теория-то, конечно, теорией...

\*\*) Тут маленькая путаница, позволю себе ее исправить. Лигандообменная хроматография была еще до Вадима Александровича. Он первый предложил ее для хирального разделения аминокислот, и, в результате, осуществил первое в истории полное разделение



рацемической смеси (это был пролин) методом жидкостной хроматографии (патент 1968г, в соавторстве с С.В. Рогожиным). Только динамическое модифицирование здесь было ни при чем. Разделение проводилось на полистирольно-пролиновой смоле.

Динамическое же модифицирование обращенной фазы N-гексадецил-L-гидроксипропином было предложено В.А. Даванковым и А.А. Кургановым только в 1980 г. Именно этот способ лигандного обмена получил впоследствии наибольшее распространение, и именно о нем говорит Леонид Викторович. Основная цель ДМ здесь, как это ни странно, – увеличить эффективность разделения (поскольку обращенные фазы могут быть эффективно упакованы, в отличие от более капризных привитых и, тем более, полимерных фаз).

\*\*\*) Краун-эфиры образуют с аминами комплексы включения. В данное время доступен ряд фаз, модифицированных краун-эфирами и химически. ДМ же краун-эфирами не может иметь "серьезных последствий", поскольку эти соединения очень дороги. Так что пользуются ими чаще в исследовательских работах.

### С.Н. Сычев. Рецензия на статью Л.В.Сапрыкина "Динамическое модифицирование в практике ВЭЖХ". С ответами автора

1. Раздел "Динамическое модифицирование ОФ ВЭЖХ систем"

Абзац: "...наиболее часто динамическое модифицирование в практике применяют для подавления активности свободных силанольных групп ..." и далее по тексту.

В том же разделе: "...правда, существует мнение..., что влияние силанольных групп ... сильно преувеличено.." Особенно и скрывать не стану, что это мое мнение, и на него есть ссылка в статье. Такое мнение подтверждается достаточно простым экспериментом, изложенным в монографии "Методы совершенствования " (С.Н.Сычев, 2000 г.). С другой стороны, не претендуя на абсолютную осведомленность (а кто без греха?), я не видел ни одной экспериментальной работы, в которой бы была четко показана зависимость между, например, числом свободных силанольных групп (при использовании элюента с содержанием воды более 5% объемных) и уширением хроматографического пика ионогенного соединения.

С этой точки зрения, я бы эти абзацы у Леонида Викторовича переделал следующим образом: "...существует мнение, что наиболее часто динамическое модифицирование... применяют для подавления активности ... силанольных групп, однако экспериментально показано, что это мнение сильно преувеличено.."

#### Ответ Л.В. Сапрыкина

Можно согласиться и с такой редакцией, но никто, надеюсь, не станет оспаривать тот факт, что эндкепированные сорбенты обладают несколько иными свойствами по отношению именно к полярным сорбатам, в частности, к органическим основаниям, нежели обычные С18. И эти различия, вероятней всего, обусловлены как раз наличием силанольных групп.

**Личное мнение редактора.** Относительно количества силанольных групп - думаю, нет четких доказательств, однако есть четкие зависимости уширения от концентрации в силикагельной матрице ионов металлов. По нынешним представлениям, опасны не просто силанольные группы, а те из них, рядом с которыми находятся электроакцепторные примеси металлов (т.н. "активные силанолы").

Кроме того, есть доказательства зависимости уширения пиков азотистых оснований от доли углерода обращенных фаз. Это уже другая история, речь о которой ведется в статье "Уширение пиков: "артефакты" или норма?"

2. Раздел "Динамическое модифицирование

НФ ВЭЖХ систем".

Абзац: "...В этом случае реализуется конкурентный механизм разделения, когда молекулы модификатора вытесняются с поверхности сорбента анализируемое вещество".

Смущают два слова: "конкуренция" и "вытеснение". Всем известно, что такое конкуренция в экономике. Но что такое "конкуренция", реализуемая путем "вытеснения" на молекулярном уровне, представить сложно. На ум приходит такая сценка: молекула модификатора (в-о-о-о-т с такими кулаками) подходит к молекуле сорбата, сидящей за стойкой бара (поверхность сорбента) и говорит: "Товарищ, я еще вчера тут очередь занял". Молекула сорбата тут же отваливает в объем.

#### Ответ Л.В. Сапрыкина

Ну на самом деле конкуренция за место на сорбенте происходит куда как сложнее. Ведь процессы сорбции-десорбции протекают за достаточно ограниченный по времени промежуток. И если молекуле сорбата подворачивается участок сорбента, стерически благоприятный для прохождения акта сорбции - десорбции, но он в данный момент занят молекулой модификатора, то этого акта просто не происходит и молекула сорбата в объеме элюента вынуждена перемещаться до следующего подходящего участка сорбента. А в итоге за счет меньшего количества таких единичных актов время выхода сорбата может существенно уменьшиться. Безусловно, это очень упрощенные рассуждения, но тем не менее...

3. "...Если попытаться дать интерпретацию в рамках квазихимических и квазиравновесных равновесий (!), то никакой разницы между распределительным и конкурентным механизмами не будет вовсе".

А может, принципиальной разницы между ними и нет? Так может, этот абзац вовсе выбросить, все-равно он неинформативен?

#### Ответ Л.В. Сапрыкина

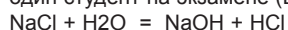
Особой разницы, возможно, и нет, но абзац выкидывать не стоит. Ведь далеко не всегда можно говорить о чисто распределительном механизме. И стоит согласиться, что не все участки сорбента одинаково привлекательны (в плане энергии сорбции и стерической доступности) для сорбата. А раз так, то и "конкуренция" и "вытеснение" могут вполне себя проявлять. Можно применить и другие термины, но такое видение процессов на поверхности сорбента вполне имеет право на жизнь. По крайней мере, так рассуждает о природе взаимодействия сорбата с сорбентом тот же Сочевинский.

**Личное мнение редактора.** "Конкуренция" и "распределение" являются, скорее, не "механизмами", а признаками, атрибутами процесса адсорбции-десорбции. Если же говорить о кинетике процесса, то экспериментально наблюдаемой характеристикой является подвижность адсорбированной молекулы, которая находится по времени релаксации ЯМР спектроскопией. Из косвенно экспериментально подтверждаемых - можно строить догадки относительно механизма десорбции (в результате упругих и неупругих столкновений), и пытаться как-то доказать это на практике. Только зачем?

4. В том же разделе абзац: "...а в работе [7] сделана безуспешная попытка ...формализовать закономерности...на динамически модифицированном силикагеле."

И то правда, зачем сочинять теорию ВЭЖХ для динамически не модифицированного силикагеля, если отсутствие такого модифицирования приводит к плохой воспроизводимости, о чем и пишет в статье Леонид Викторович! Это не критика: хотелось бы подчеркнуть, что сочинение теорий в НФ ВЭЖХ на динамически не модифицированных силикагелях никому не нужно, так как на практике такую теорию все равно использовать нельзя.

Возможно неудачная, но все-же, аналогия. Как-то один студент на экзамене (Витей зовут) пишет гидролиз:



- Как же так, Витя! Ты приходишь домой голодный, а мама наливает тебе вместо супа смесь кислоты и щелочи!  
- Сергей Николаевич! Так это же теория!

#### Ответ Л.В. Сапрыкина

Тут возразить нечего. Увы, хроматографистов-теоретиков развелось сверх всякой меры. И эквилибристика с громоздкими формулами, никак не связанная с практикой и экспериментом, да еще и при неправомерных допущениях и упрощениях - стала вещью обыденной даже в серьезных журналах и на солидных конференциях.

Замечания закончились, перейдем к комментариям.

1. Как ни странно, приоритет в области динамического модифицирования принадлежит российским ученым. Насколько хватает моих знаний: М.С.Цвет, значительно позже - В.Я.Давыдов и А.В.Киселев. Наконец, в 1986 г. вышла статья рецензента по критериям адсорбционного модифицирования и принципу формирования динамически-модифицированных поверхностей в НФ ВЭЖХ (Сычев, Аксенова, Криволапов, ЖФХ, 1986 г.). С периодичностью 15 - 20 лет интерес к динамической модификации возрастает и это справедливо. Так что очень хорошо, что у нас есть Леонид Викторович.

2. Раз речь идет о практическом применении, то Леониду Викторовичу, на мой взгляд, поестче надо было бы обозначить (он это сделал, но хотелось бы поакцентированней): в НФ ВЭЖХ перемодификация колонок практически невозможна. Действует правило: одна задача - одна колонка.

#### Ответ Л.В. Сапрыкина

Да куда уж поакцентированней! Я и так это в разной связи по тексту высказал аж три раза.

3. Несмотря на замечательные хроматограммы, ДИРФ - режим в большинстве случаев крайне капризный по отношению к внешним воздействиям (в отличие от, например адсорбционного модифицирования). Внешняя простота методик крайне обманчива, особенно при подготовке колонки к работе. Чисто эмоционально удачная процедура воспринимается каждый раз как маленькое чудо.

#### Ответ Л.В. Сапрыкина

Нельзя не согласиться с этим утверждением, но когда ничего не остается, вот тогда и вытаскиваем этот козырь из рукава...

4. Разработка методик в ДИРФ - режиме - крайне мучительная процедура и далеко не всем по плечу: можно угробить кучу колонок и времени - и ничего не добиться. Уже готовые системы стоят неплохо, так что за готовые вещи авторов нужно только благодарить.

#### Ответ Л.В. Сапрыкина

Мучительность процедуры разработки методик разделения в ДИРФ обусловлена не столько сложностью постановки эксперимента и соблюдения абсолютно воспроизводимых условий разделения (а это в ДИРФ очень не просто), сколько непредсказуемостью результата. Ведь при определенных концентрациях ацетонитрила и соли для отдельных сорбатов (особенно полифункциональных) можно попасть в режим обращенного по элюирующей силе градиента. А это еще тот капкан...

5. По поводу теории ДМ. Боюсь, что в ближайшее время здесь похвастать будет нечем. Даже в режиме адсорбционного модифицирования, подразумевающего образование на поверхности сорбента одного-двух слоев смеси модификаторов, для рассмотрения теории катастрофически не хватает обычных экспериментальных изотерм адсорбции из разных растворов. С органическими кислотами удалось разобраться во многом благодаря работе Н.Н.Грязева (Саратовский университет, "Вестник саратовского университета, 1956 г.) Кто и для кого сейчас будет выполнять эту черновую работу? С ДИРФ-режимом еще сложнее, и никакие фракталы здесь не помогут до тех пор, пока не будет надежных экспериментальных данных по структуре многокомпонентных растворов на границе раздела фаз. Фракталы - это всего лишь математика, с помощью которой можно моделировать неравновесные процессы, но не пригодная для получения исходных уравнений, описывающих явление.

#### Ответ Л.В. Сапрыкина

Фракталы конечно же - не панацея, а всего лишь понятие из теории распознавания образов и упомянуты как вариант способа компактного описания или характеристики данной хроматографической системы. Возможно, в этом плане полезен будет тот же факторный анализ или вычисление инкрементов удерживания. Одно бесспорно: для реализации любого варианта необходим большой объем черновой работы по получению обширнейшего массива экспериментальных данных.

**Личное мнение редактора.** И сейчас в академических институтах делается огромное количество черновой работы, но местами совсем уж какой-то бессмысленной...

Очень рад, что такая работа появилась, рецензию писал с большим удовольствием.

Хорошая, добротная классификация, ничего в ней менять не нужно.

Ну, и Леонид Викторович - просто молодец, замечательный хроматографист и эрудит.

В заключение мне хотелось бы поблагодарить Леонида Викторовича за отличную работу, а редактора - за предоставленную возможность высказать свое мнение. Рекомендация: статью опубликовать без купюр и исправлений.

**(Статья принята к печати по двум положительным рецензиям)**

Код III г