

ЛАМОТ С. БРАЙНДЛ, Р., БИШОФ Л.Д.

### **POPLC®: НОВЫЙ И ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ**

*Программное компьютерное обеспечение POPLC® позволяет подобрать соотношение разных неподвижных фаз для оптимального разделения смеси веществ в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для этого используется нового типа колонка, в которой каждая фаза находится в виде отдельного картриджного сегмента. Составленная при помощи программного обеспечения POPLC® Optimizer сегментированная колонка может успешно разделить те вещества, которые не удастся разделить при применении одной стационарной фазы, как, например, в случае определения смеси триазиновых гербицидов в поверхностных водах.*

*Програмне комп'ютерне забезпечення POPLC® дозволяє підібрати співвідношення різних нерухомих фаз для оптимального розділення суміші речовин у високоефективній рідинній хроматографії. Для цього використовується нового типу колонка, в якій кожна фаза знаходиться у вигляді окремого картриджного сегменту. Складена за допомогою програмного забезпечення Poplc® Optimizer сегментована колонка може успішно розділити ті речовини, які не вдається розділити при застосуванні однієї стаціонарної фази, як, наприклад, у випадку визначення суміші триазинових гербицидів в поверхневих водах.*

*Computer Poplc® software (Phase OPTimized Liquid Chromatography) allows to select correlation of different immobile phases for the optimum separation of substances mixture in high performance liquid chromatography. For this purpose used new type a column in which every phase is as a separate segment. The segmented column, adjusted through POPLC® Optimizer software, can successfully separate those matters which do not succeed to be divided by one stationary phase, for example, in the case of determination of mixture of triazine herbicides in superficial waters.*

#### **Введение**

Для оптимизации хроматографического разделения могут использоваться различные технологии подбора условий. В одних случаях предпочитают оставлять стационарную фазу неизменной и оптимизировать параметры хроматографического разделения за счет варьирования рН подвижной фазы, типа органического растворителя, например, метанола или ацетонитрила, температуры. В других случаях применяют стандартный градиент подачи растворителя на разные колонки и выби-

рают наиболее подходящую колонку для проведения дальнейшей оптимизации. Также существуют способы подбора оптимальной подвижной фазы с привлечением программного компьютерного обеспечения. Этот путь помогает сэкономить много времени, по сравнению с ручной процедурой. Тем не менее, программное обеспечение не может помочь в проблеме разделения двух анализируемых компонентов, если они не разделяются на выбранной стационарной фазе.

В жидкостной хроматографии на оптимизированной фазе (Phase OPTimized Liquid Chromatography, POPLC®) процесс оптимизации проводится по другому принципу. Здесь подвижная фаза остается неизменной, а подбирается стационарная фаза с целью достижения наилучших параметров хроматографического разделения. POPLC® основывается на теории модели "Призма" (рис. 1), которая использовалась для оптимизации подвижной фазы главным образом в тонкослойной хроматографии и прямофазной ВЭЖХ [1].

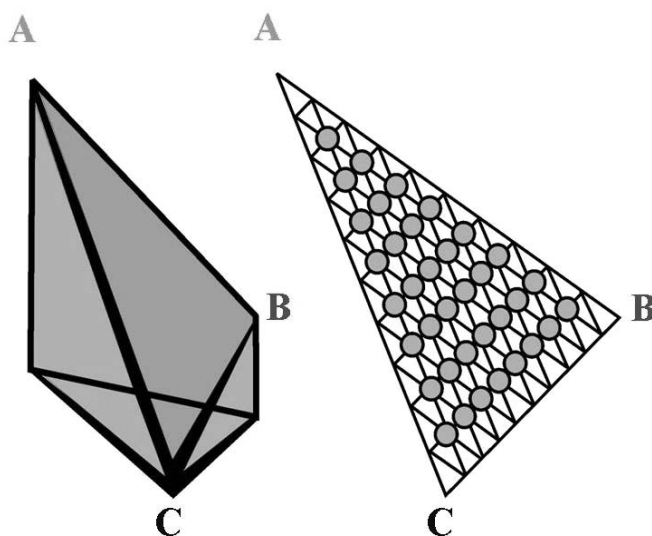


Рис. 1. Модель "Призма"

Вертикальная сторона призмы соответствует силе удерживания, которая пропорциональна времени удерживания данного анализа на данной стационарной фазе. Как правило, одна стационарная фаза не дает оптимального времени удерживания анализа на сорбенте. Для получения оптимального времени удерживания анализа на колонке нужно определить оптимальную силу удерживания. В модели "Призма" оптимальная сила удерживания анализа лежит на поверхности, образованной вершиной неправильного треугольника призмы. Любую точку треугольника можно получить комбинацией стационарных фаз А, В и С, имеющих различные адсорбционные свойства по отношению к анализу. Таким образом, колонка должна быть наполнена разными сорбентами. Технически это реализовано с помощью системы сегментированных колонок показанных на Рис 2. Фактически, такая колонка состоит из сегментов, наполненных разными стационарными фазами (А, В, С). Колонка может собираться из сегментов различной длины. На данный момент коммерчески доступны сегменты длиной 10, 20, 40, 60 и 80 мм, наполненные различными по своей адсорбционной природе стационарными фазами. Сегменты имеют картриджное строение и крепятся между собой фиксаторами. Они сочетаются по технологии безкапиллярного соединения, что обеспечивает почти нулевой мертвый объем между картриджами. Таким способом можно собрать колонку любой разумной длины и состоящую из разных сорбентов. Сегментированная колонка на концах имеет стандартные фитинги для присоединения к высокоэффективным жидкостным хроматографам.



Рис. 2. Система сегментированных колонок POPLink®

Общее время удерживания аналита на колонке является суммой времен удержаний аналита на каждом сегменте, заполненном отдельным сорбентом, и не зависит от порядка расположения отдельных сегментов. Откорректировать время удержания аналита на колонке можно путем комбинации сегментов разной длины и с разными сорбентами.

### *Метод*

На первом этапе определяется наиболее подходящая подвижная фаза (элюент). Для этого используется короткая 20 мм колонка, заполненная фазой с наибольшей силой удерживания. Как правило, такой фазой является обращенная фаза — C18. При использовании оптимального элюента, последний компонент должен иметь коэффициент удержания  $k$  около 10. Коэффициент  $k$  является отношением времени, которое аналит проводит на сорбенте, к времени его нахождения в элюенте. При значении  $k = 10$ , анализируемое вещество должно выйти с колонки приблизительно за 2 минуты. В зависимости от свойств аналита (кислотные, основные или амфотерные), для достижения оптимального коэффициента удержания, может потребоваться модификация элюента, например, корректировка полярности, pH.

На следующем этапе определяются времена удержания каждого из компонентов смеси на разных стационарных фазах (берутся сегменты от 20 до 60 мм), при элюировании одной и той же подвижной фазой в изократическом режиме. Стационарные фазы, используемые для измерений времен удержания, должны иметь различную селективность и природу взаимодействия с аналитом. Наибольший эффект достигается, при применении сорбентов, имеющих разный характер взаимодействия с аналитом, В качестве базового набора нами были использованы следующие сорбенты с привитыми фазами:

ProntoSIL 100-5-C18 SH-2, проявляющий классические свойства стационарной фазы C18;

ProntoSIL 100-5-C18 EPS-2, фаза C18 с улучшенной полярной селективностью, в котором содержатся амидные группы, усиливающие селективность по отношению к полярным соединениям;

ProntoSIL 100-5-Phenyl-2 и ProntoSIL 100-5-CN-2 — стационарные фазы с фенильными и цианопропильными заместителями;

ProntoSIL 200-5-C30, имеющую пространственно-структурную селективность, благодаря длинным углеводородным радикалам C30 привитой фазы.

Удерживание анализируемых веществ на каждой из этих фаз различно из-за различного механизма взаимодействия с сорбентом. Индивидуальные времена удерживания на каждой стационарной фазе используются для расчетов, которые проводит программное обеспечение POPLC® Optimizer. Параметрами оптимизации являются минимально допустимое разрешение (отношение разницы времен удерживания к ширине пика) и селективность (отношение времен удерживания двух соседних пиков), а также максимально допустимое время анализа. Программное обеспечение рассчитывает "оптимальную" и "наилучшую" комбинацию сегментов колонок для оптимального разделения, при котором наилучшим образом удовлетворяются требования по селективности или разрешению за наиболее короткое время. "Наилучшим" является разделение, которое дает наилучшее разрешение, и селективность на заданном промежутке времени.

Таким образом, пользователь получает рекомендацию по использованию сегментов определенной длины и состава и заранее знает результат разделения, который получится в результате хроматографирования.

### Пример

Следующий пример показывает разделение триазинов. Триазины используются в качестве гербицидов и находятся в поверхностных водах. Из-за большой химической схожести триазинов, их достаточно сложно разделить методом ВЭЖХ. На рис. 3 показаны хроматограммы, полученные при хроматографировании смеси триазинов в одинаковых условиях (поток, температура, детектирование, состав элюента) на разных колонках, состоящих из одного сегмента определенной фазы.

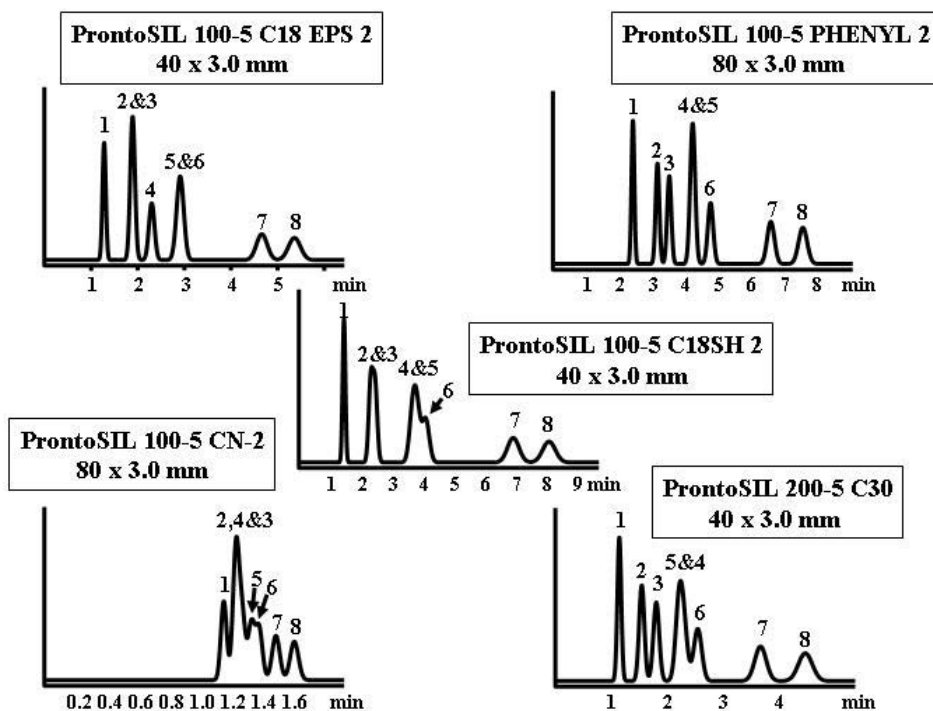
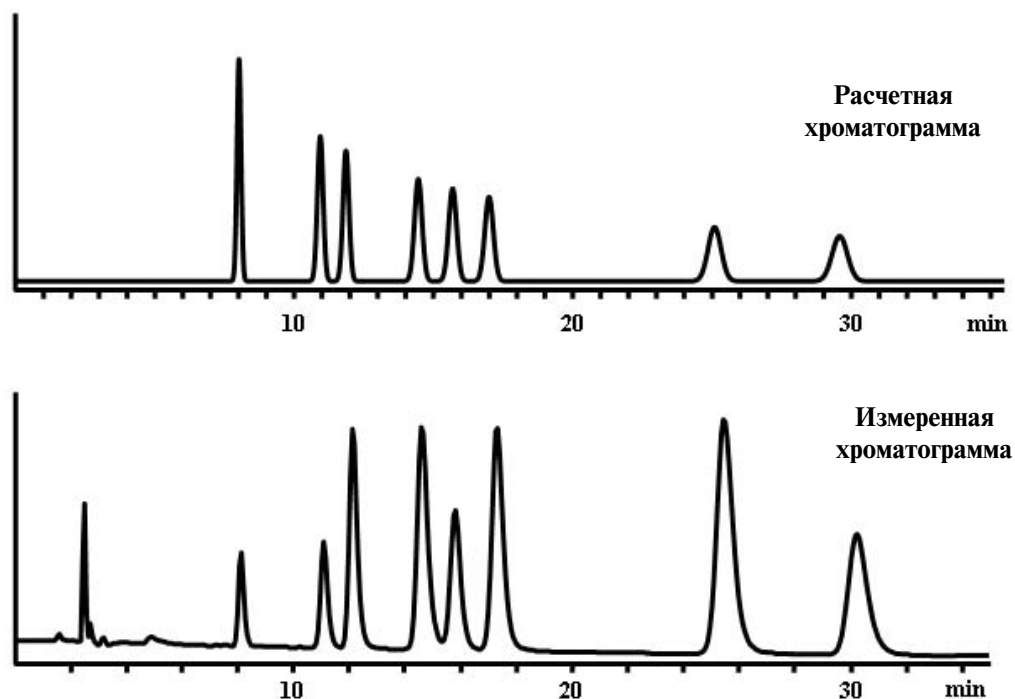


Рис. 3. Разделение смеси триазинов на 5 различных стационарных фазах.

Элюент: Метанол/Вода 49/51 (w:w). Поток: 0,56 мл/мин. Детектирование: UV @ 210 нм.

Образец: 1 Прометон, 2 Симетрин, 3 Аметрин, 4 Прометрин, 5 Тербутрин, 6 Симазин, 7 Атразин, 8 Пропазин

Как видно из приведенных пяти хроматограмм, ни одна из индивидуальных фаз не может обеспечить надлежащей селективности разделения аналитов. При этом на разных фазах наблюдается слияние различных пиков аналитов. Например, на колонке, состоящей только из ProntoSIL 100-5-C18 EPS-2 симетрин выходит вместе с аметрином, а тербутрин – вместе с симазином, хотя порядок выхода аналитов сохраняется. Некоторые компоненты можно разделить с помощью используемых стационарных фаз, в то время, как для разделения других компонентов требуется использование фаз. Только использованием комбинации сорбентов возможно добиться разделения всех 8 компонентов анализируемой смеси триазинов (Рис. 4).



**Рис.4. Сравнение хроматограмм, одна из которых получена расчетным путем с помощью программного обеспечения POPLC® Optimizer, а другая – измеренная на колонке, составленной из сегментов стационарных фаз.**

Для смеси Триазинов была подобрана наилучшая с точки зрения разрешения сегментная POPLC™ колонка, состоящая из следующих сегментов:

Сегмент: C18EPS, длина: 10 мм x 8 = 80 мм

Сегмент: C30, длина: 10 мм x 12 = 120 мм

Сегмент: CN, длина: 10 мм x 9 = 90 мм

Сегмент: Фенил, длина: 10 мм x 1 = 10 мм

Общая длина POPLC™ колонки: 300 мм

Мертвый объем: 2.25 мин

Количество тарелок: 10370

Максимально допустимое время анализа: 30 минут

Селективность: 1.097 (наихудшая пара: Пропазин – Аметрин)

Разрешение: 2.226 (критичная пара: Прометон – Пропазин)

Условия хроматографирования применялись те же, что и при использовании индивидуальных стационарных фаз:

Элюент: Метанол/Вода 49/51 (w:w)

Поток: 0,56 мл/мин

Детектирование: UV @ 210 нм

Результат компьютерной оптимизации на POPLC<sup>®</sup> демонстрирует отличную корреляцию с реальным анализом. Обычно, расхождение между предсказанным и измеренным результатом не превышает 3%.

### *Дополнительные преимущества*

Благодаря тому, что время удержания каждого анализируемого вещества можно откорректировать путем подбора композиции стационарных фаз, во многих случаях не требуется использование градиентного элюирования. Таким образом, POPLC<sup>®</sup> позволяет использовать те детекторы, которые невозможно использовать в градиентном режиме: рефрактометрический, электрохимический и кондуктометрический. Также в высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-спектрометрического детектора лучше избежать использования градиентного элюирования из-за необходимости постоянства условий ионизации.

Даже в тех случаях, когда необходимо использовать градиент из-за широкого диапазона полярности аналитов, POPLC<sup>®</sup> всегда предложит наиболее подходящую колонку для каждого разделения.

### *Вывод*

POPLC<sup>®</sup> – новый и инновационный инструмент для разработки методов ВЭЖХ. Его легко применить к любому высокоэффективному жидкостному хроматографу. В подавляющем большинстве случаев эта методика не требует градиентного элюирования. Таким образом, нет необходимости использовать метод проб и ошибок для подбора подходящей колонки для разделения, поскольку метод POPLC<sup>®</sup> приводит к выбору идеальной колонки для каждого разделения.

### *Благодарность*

Авторы хотели бы поблагодарить профессора Dr. Sz. Nyiredy, Budakalasz, Венгрия за великолепную идею использования модель "Призма" для расчета селективности оптимизированной стационарной фазы.

### *ЛИТЕРАТУРА*

- [1] Sz. Nyiredy, K. Dallenbach-Tolke, O. Sticher, Journal of Planar Chromatography, 1, 1988, 336 ff

*Stefan Lamotte, Rainer Brindle, Klaus D. Bischoff*  
*Bischoff Chromatography, Boebling Str. 23, D-71229 Leonberg, Germany*  
*Tel.: ++49-7152-60640, FAX: ++49-7152-606434,*  
*e-mail: info@bischoff-chrom.de, web: <http://www.poplc.de>*  
*Представительство в Украине:*  
*Донау Лаб, ул Лауреатская 73, Киев, Украина.*  
*T. +380-44-258 7756, Ф. +380-44-258 2708,*  
*e-mail: office-ua@donaulab.com, web: <http://www.donaulab.com>*