

УДК 519.67, 517.955.8

ДИНАМИЧЕСКАЯ КАРТА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРЕМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А. Г. Прудковский¹

Представлен алгоритм визуализации переменных процессов в высокоэффективной жидкостной хроматографии в виде динамической карты хроматографической системы. Дан пример использования динамической карты для выбора оптимального по времени градиентного режима ионной хроматографии.

Ключевые слова: высокоэффективная градиентная хроматография, математическое моделирование, карта хроматографического удерживания.

1. Введение. Выбор режима анализа для переменной (градиентной) высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) представляет собой сложную задачу. В общем виде эта задача до сих пор не решена. Рассмотрены только частные задачи с линейным [1–3] и кусочно-постоянным [4] профилем задания градиента. Одним из основных инструментов визуализации постоянных режимов ВЭЖХ является карта хроматографической системы [3, 5], а при учете кинетических характеристик — динамическая карта хроматографической системы (ДКХС) [6], которая позволяет выбирать оптимальные режимы разделения компонентов.

1.1. Понятие изократической ДКХС. Отметим основные особенности изократической ДКХС, описывающей постоянные (изократические) режимы анализа, которые помогут корректно обосновать формулы построения градиентной ДКХС для переменных режимов.

Основные параметры пиков на хроматограмме: исправленное время удерживания t'_i и ширина пика $\tau_i = 2\sigma_i\sqrt{2 \ln 2}$, где σ_i^2 — дисперсия. Исправленным время $t'_i = t_i - t_0$ называется потому, что оно не учитывает так называемое “мертвое” время системы t_0 — время прохождения неудерживаемого компонента через систему. При постоянных режимах параметры пиков на хроматограмме находят по формулам [7]

$$t'_i = \frac{L}{v} \Gamma_i, \quad \sigma_i^2 = H_i L \frac{(\Gamma_i + 1)^2}{v^2}, \quad (1)$$

где L — длина разделяющей колонки; v — скорость подвижной фазы (ПФ, или элюента) в колонке; Γ_i — коэффициент распределения i -го компонента, связанный с физико-химическими свойствами компонента, сорбента и подвижной фазы; H_i — высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ) и определяемая характерной длиной колонки, на которой система подвижной и неподвижной фаз достигает равновесия. Более строгое определение ВЭТТ будет дано ниже при рассмотрении свойств решения соответствующей системы уравнений.

Наглядное представление о поведении аналитов дает карта хроматографического удерживания, на которую наносят характеристики всех компонентов пробы. Обычно в качестве независимой переменной при построении карты используют концентрацию элюента (ее логарифм) [3, 5] или, как это было сделано в [6], силу элюента X . В любом случае для визуализации относительного положения пиков на хроматограмме удобнее брать за основу некий опорный компонент, характеристики которого хорошо известны. В случае постоянных режимов на оси ординат для каждого разделяемого компонента откладывается логарифм относительного времени удерживания

$$y_i = \log\left(\frac{t'_i}{t'_O}\right), \quad (2)$$

а на оси абсцисс откладывается основная характеристика: *сила элюента*; формально эту величину можно положить равной логарифму коэффициента распределения опорного компонента:

$$X = -\log(\Gamma_O). \quad (3)$$

¹ Институт геохимии и аналитической химии РАН им. В. И. Вернадского (ГЕОХИ РАН), ул. Косыгина, 19, 119991, Москва; ст. науч. сотр., e-mail: prudkovsky@gmail.com

В зависимости от X отношение $\frac{t'_i}{t'_O}$ изменяется, показывая относительное расположение соответствующих пиков на хроматограмме. Для уверенного разделения близких пиков необходима не только информация о положении максимумов пиков, но и оценка критерия разделения двух соседних пиков: $R_{ij} = \frac{|t'_i - t'_j|}{\tau_i + \tau_j}$. Таким образом, если два временных отрезка $[t'_i - R\tau_i, t'_i + R\tau_i]$ и $[t'_j - R\tau_j, t'_j + R\tau_j]$ не пересекаются, то критерий разделения пиков i и j на хроматограмме будет больше величины R . На карте хроматографического удерживания эти отрезки (в зависимости от величины X) отобразятся в виде полос $y_{i\pm} = \log(t'_i \pm R\tau_i) - \log t'_O$. Полученную таким образом карту принято называть динамической картой хроматографической системы (ДКХС) [6], поскольку она отражает не только равновесные характеристики процесса, но и кинетические (ВЭГТ), от которых зависит ширина пиков на хроматограмме.

На изократической ДКХС из соотношений (2) и (3) следует связь между координатами карты X, y и исправленным временем t' :

$$t'_O = \frac{L}{v} \Gamma_O = \frac{L}{v} 10^{-X}; \quad y = \log t' - \log t'_O = \log t' - \log \frac{L}{v} + X. \tag{4}$$

Из соотношений (4) следует, что опорный компонент отображается на ДКХС полосой, центр которой соответствует горизонтальной прямой $y = 0$, а изохроны наклонены под углом 45 градусов к оси X , время убывает с убыванием ординаты y или с ростом абсциссы X .

Как следует из правил построения ДКХС, постоянный режим анализа отображается на карте вертикальной линией $X = \text{const}$; пересечения полос на этой вертикали соответствуют пересечению пиков на хроматограмме, так что разрешенными для анализа (при постоянных режимах) считаются области с отсутствием пересечений. Полосы, пересечение которых ограничивает ту или иную разрешенную область называют *критическими* [8].

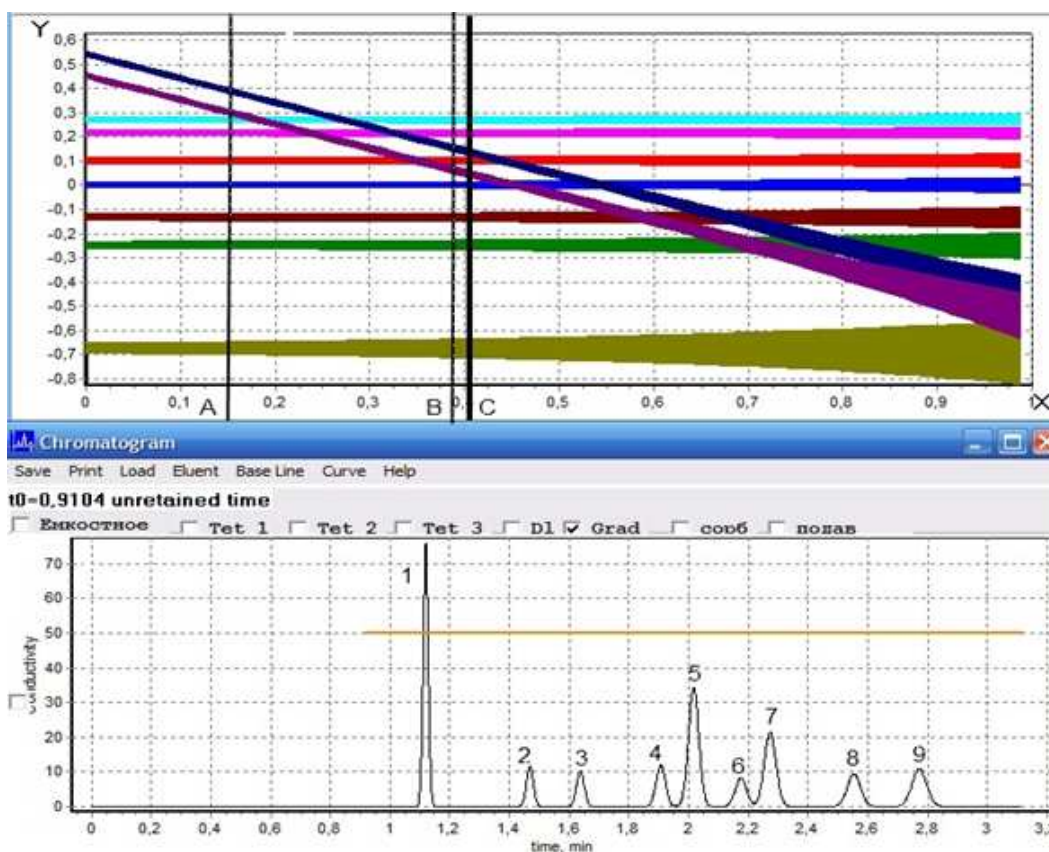


Рис. 1. Динамическая карта и хроматограмма для смеси анионов

На рис. 1 представлена изократическая ДКХС для ионнохроматографической системы [9], номера полос на карте идут снизу вверх по линии C: 1) JO_3^- , 2) F^- , 3) HCOO^- , 4) Cl^- , 5) PO_4^{2-} , 6) NO_2^- , 7) SO_4^{2-} , 8) Br^- , 9) NO_3^- . Ширина полос соответствует степени разделения $R = 1$ и следующим характеристикам:

разделяющая колонка 180×3 мм; сорбент со структурой поверхностно-привитого ионита AS-14a зернением 5 ± 0.5 мкм с толщиной оболочки 140 нм и емкостью 0.038 мэкв/мл; подавитель-электродиализатор ASRS-ULTRA2-mm; расход карбонатного элюента 0.5 мл/мин.; точке C соответствует концентрация 62.9 Мм при pH = 10.82.

На данной карте разрешенными являются: область $X < A$ и область $B \leq X \leq C$, причем в каждой из этих разрешенных областей наиболее выгодной по времени в силу (4) является самая правая граница. В области $[B, C]$ это будет точка $X = C$, для которой и построена модельная хроматограмма. Заметим, что для описания реальной задачи обычно не хватает одной переменной X , в данном конкретном примере на рис. 1 существует еще один существенный аргумент pH, который также следует учитывать при выборе оптимальных по времени режимов анализа.

Таким образом, изократическая ДКХС дает наглядное представление о возможных режимах данной хроматографической системы, позволяет выбрать оптимальный по времени режим анализа и определить последовательность пиков аналита на хроматограмме. Отметим, что расчет дисперсии по формуле (1) существенно необходим для ДКХС. Без дисперсии невозможно оценить ширину полос на карте, а следовательно, определить границы запрещенных и разрешенных участков. Целью настоящей статьи является построение ДКХС для переменных (градиентных) режимов ВЭЖХ.

2. Обобщение ДКХС на переменные режимы анализа. Для построения градиентной ДКХС необходимо рассмотреть систему уравнений, описывающую управление процессами в разделяющей колонке хроматографа. В простейшем случае, когда компонент имеет только одну сорбируемую форму, такая система имеет вид [7]

$$\begin{aligned} \frac{\partial a_i}{\partial t} &= -\frac{1}{\theta_i} a_i + \frac{\Gamma_i}{\theta_i} c_i, \\ \frac{\partial c_i}{\partial t} &= \left(\frac{1}{\theta_i} a_i - \frac{\Gamma_i}{\theta_i} c_i \right) - \frac{\partial}{\partial x} (v c_i) + \frac{\partial}{\partial x} \left(D_i \frac{\partial c_i}{\partial x} \right), \\ c_i(0, 0) &= c_{i0}(x), \quad a_i(0, 0) = 0, \end{aligned} \quad (5)$$

где $a_i(x, t)$, $c_i(x, t)$ — концентрации неподвижной и подвижной фазы i -го компонента в колонке длиной L , подвижная фаза движется с постоянной скоростью v ; $x \in [0, L]$ — пространственная, а $t \in [0, T]$ — временная координаты; Γ_i — коэффициент распределения, определяющий равновесные характеристики процесса; θ_i и D_i — соответственно характерное время сорбции и коэффициент продольной диффузии. Переменные режимы в ВЭЖХ определяются зависимостью от времени параметров ПФ на входе в колонку. Коэффициенты Γ_i , θ_i и D_i уравнений (5) зависят от свойств ПФ, которую в свою очередь можно характеризовать параметром $X(t - x/v)$, если скорость фронта вариаций ПФ совпадает со скоростью v .

Высокоэффективная хроматография отличается относительной малостью величин $\theta_i \ll L/v$, $D_i \ll Lv$ и дисперсией начальной функции $c_{i0}(x)$, так что решение системы (5) можно оценивать асимптотическими методами. Оценки для двух первых моментов решения (положения пика на хроматограмме и его дисперсии) в случае переменных коэффициентов Γ_i , θ_i , D_i , v с произвольной зависимостью от координат (x, t) для системы из n уравнений общего вида были сделаны в работе [10].

Для системы (5) в случае ВЭЖХ, когда скорость фронта вариаций подвижной фазы совпадает со скоростью v , эти оценки имеют вид

$$L = v \int_0^{t'_i} \frac{d\xi}{\Gamma_i(X(\xi))}, \quad (6)$$

$$\sigma_i^2 = \frac{\Gamma_i^2(X(t'))}{v} \int_0^{t'_i} \frac{H_i(\xi)}{\Gamma_i^3(X(\xi))} (\Gamma_i(X(\xi)) + 1)^2 d\xi, \quad (7)$$

где $H_i(t) = \left[\frac{2v\Gamma_i(X(t))\theta_i(X(t))}{[\Gamma_i(X(t)) + 1]^2} + 2 \frac{D_i(X(t))}{v} \right]$ — высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ).

Формула (6) позволяет найти исправленное время удерживания компонента t'_i , а формула (7) — вычислить дисперсию σ_i^2 пика на хроматограмме (начальной дисперсией функции $c_{i0}(x)$ обычно пренебрегают в силу ее малости). При постоянных режимах формулы (6), (7) переходят в формулы (1).

Основой ДКХС является опорный компонент, середина полосы которого совпадает с линией $y = 0$. Любой компонент, подобный опорному, т.е. имеющий пропорциональный ему коэффициент распределения

$\Gamma(X) = K \Gamma_O(X)$, отображается на ДКХС в силу (1), (2) горизонтальной линией с координатой $y = \log K$. Так, в примере из ионной хроматографии на рис. 1 за опорный компонент взят однозарядный ион Cl^- и все компоненты, соответствующие однозарядным ионам, отображаются на карте в виде горизонтальных полос. Руководствуясь этим правилом, определим траекторию переменного режима на градиентной ДКХС как зависимость состава подвижной фазы от времени, отображаемой на карте соотношением для $X(t')$, которое задается пользователем, и соотношением

$$y(t') = \log \left[\frac{v}{L} \int_0^{t'} 10^{X(\xi)} d\xi \right]. \tag{8}$$

Интегрирование в (8) производится в соответствии с переменным режимом задания силы элюента $X(t)$ на входе в разделяющую колонку.

Тогда ордината полосы для компонента, подобного опорному $\Gamma(X) = K \Gamma_O(X)$, в силу (6), (8) будет удовлетворять соотношению

$$L = v \int_0^{t'_i} \frac{d\xi}{\Gamma_i(X(\xi))} = \frac{v}{K} \int_0^{t'_i} 10^{X(\xi)} d\xi = \frac{L}{K} 10^{y(t')},$$

или $y(t') = \log K$, что и требовалось.

Для произвольного компонента i , определяемого на траектории зависимостью коэффициента распределения $\Gamma_i(X)$, ордината $y(t'_i)$ определяется ординатой некоторого компонента, подобного опорному, с такой константой обмена K_i , чтобы их исправленные времена удерживания совпадали, т.е.

$$y_i(t') = \log K_i = \log \left[\frac{v}{L} \int_0^{t'_i} 10^{X(\xi)} d\xi \right], \tag{9}$$

где исправленное время удерживания i -го компонента определяется по формуле (6).

Определение (9) обеспечивает главное свойство ДКХС: пересечение полос на карте соответствует реальному пересечению пиков на хроматограмме.

Ординаты полос компонентов, *не подобных* опорному, зависят от задания траектории (8) и при варьировании траектории могут изменяться. При поиске нужного режима градиентная карта не остается постоянной, а изменяется непосредственно во время процедуры построения траектории, что возможно, если построение ведется по шагам в прямом взаимодействии с компьютерной моделью процесса. Алгоритм такого процесса может быть следующим.

1. Первоначально задаем изократическую ДКХС.

2. Чертим на этой карте произвольный малый отрезок будущей траектории с положительным приращением координаты $\Delta y > 0$ и произвольным ΔX : $X_M = X + \Delta X$, $y_M = y + \Delta y$.

3. По формуле (8) рассчитываем очередную точку t'_M на траектории:

$$X_M = X(t'_M), \quad y_M = \log \left[\frac{v}{L} \int_0^{t'_M} 10^{X(\xi)} d\xi \right] \approx \log \left[\frac{v}{L} \frac{(10^X + 10^{X+\Delta X})}{2} t'_M \right].$$

4. Процесс построения градиентной карты для момента времени t'_M начинается с деления карты условной горизонтальной линией y_M . Под этой линией — полосы уже вышедших компонентов, изменить времена выхода и ширину полос которых невозможно; над этой линией траекторию еще предстоит построить. Для каждого X строим карту еще не вышедших компонентов в соответствии с формулой (9), условно считая, что для каждого X при $t' > t'_M$ режим будет постоянным:

$$y_i(t') = \log \left\{ 10^{y_M} + 10^X \frac{v}{L} (t'_i - t'_M) \right\}. \tag{10}$$

Здесь исправленное время t'_i находится из уравнения

$$L = v \int_0^{t'_i} \frac{d\xi}{\Gamma_i(X(\xi))} = v \int_0^{t'_M} \frac{d\xi}{\Gamma_i(X(\xi))} + \frac{v(t'_i - t'_M)}{\Gamma_i(X)}, \quad \text{или} \quad (t'_i - t'_M) = \Gamma_i(X) \left[\frac{L}{v} - \int_0^{t'_M} \frac{d\xi}{\Gamma_i(X(\xi))} \right]. \tag{11}$$

Подставляя (11) в (10), для каждого фиксированного X получим

$$y_i(t') = \log \left\{ 10^{y_M} + 10^X \Gamma_i(X) \left(1 - \frac{v}{L} \int_0^{t'_M} \frac{d\xi}{\Gamma_i(X(\xi))} \right) \right\}. \quad (12)$$

5. Формула (12) определяет центры полос компонентов на виртуальной карте при $t' > t'_M$, $y > y_M$. Для построения полос на карте осталось для каждого фиксированного значения абсциссы X вычислить ширину полос по формуле (7):

$$\sigma_i^2 = \frac{\Gamma_i^2(X(t'))}{v} \int_0^{t'_i} \frac{H_i(\xi)}{\Gamma_i^3(X(\xi))} (\Gamma_i(X(\xi)) + 1)^2 d\xi = \sigma_{iM}^2 \frac{\Gamma_i^2(X)}{\Gamma_i^2(X_M)} + \frac{H_i(X)}{\Gamma_i(X)} \frac{(\Gamma_i(X) + 1)^2}{v} (t'_i - t'_M),$$

$$\sigma_{iM}^2 = \frac{\Gamma_i^2(X_M)}{v} \int_0^{t'_M} \frac{H_i(\xi)}{\Gamma_i^3(X(\xi))} (\Gamma_i(X(\xi)) + 1)^2 d\xi, \quad H_i(X) = \left[\frac{2v \Gamma_i(X) \theta_i(X)}{[\Gamma_i(X) + 1]^2} + 2 \frac{D_i(X)}{v} \right].$$

Величина $(t' - t'_M)$ вычисляется в (11), а ширина полосы — путем подстановки $R\tau_i = 2R\sigma_i\sqrt{2\ln 2}$ в формулу (12):

$$y_i(t' \pm R\tau_i) = \log \left\{ 10^{y_M} + 10^X \Gamma_i(X) \left(1 - \frac{v}{L} \int_0^{t'_M} \frac{d\xi}{\Gamma_i(X(\xi))} \right) \pm 10^X \frac{v}{L} R\tau_i \right\}.$$

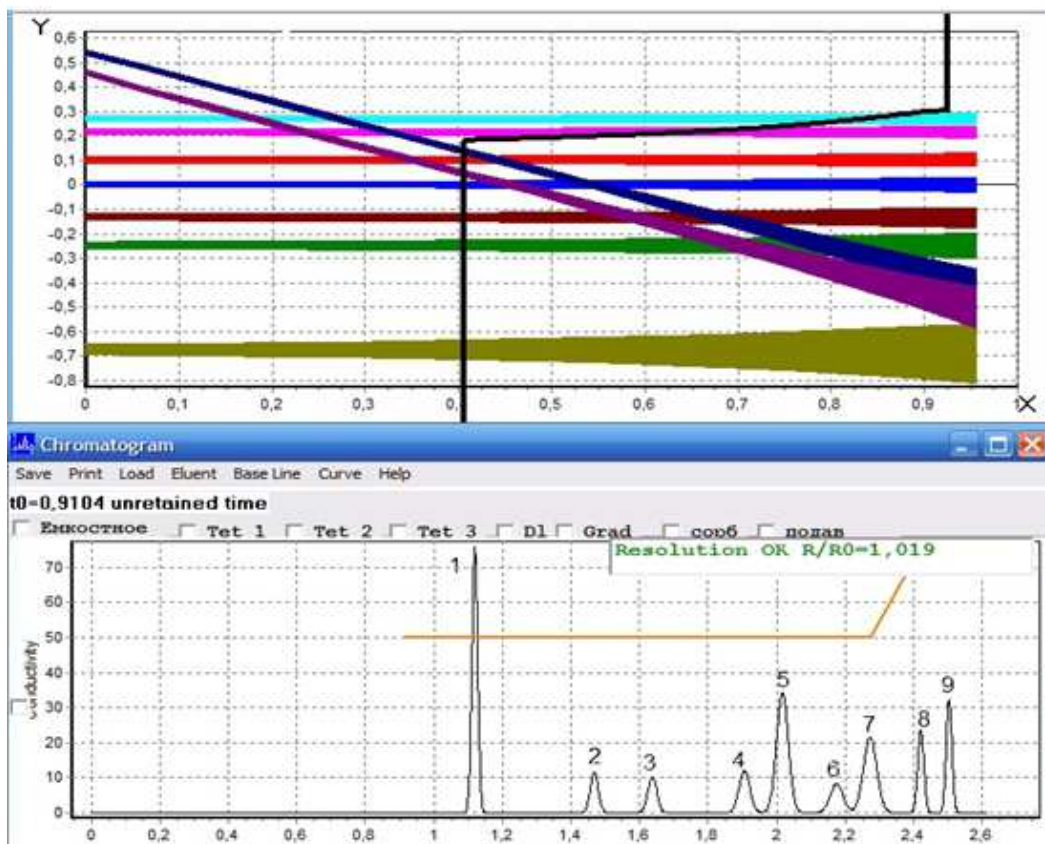


Рис. 2. Результаты оптимизации методом критических компонентов изократического режима, представленного на рис. 1

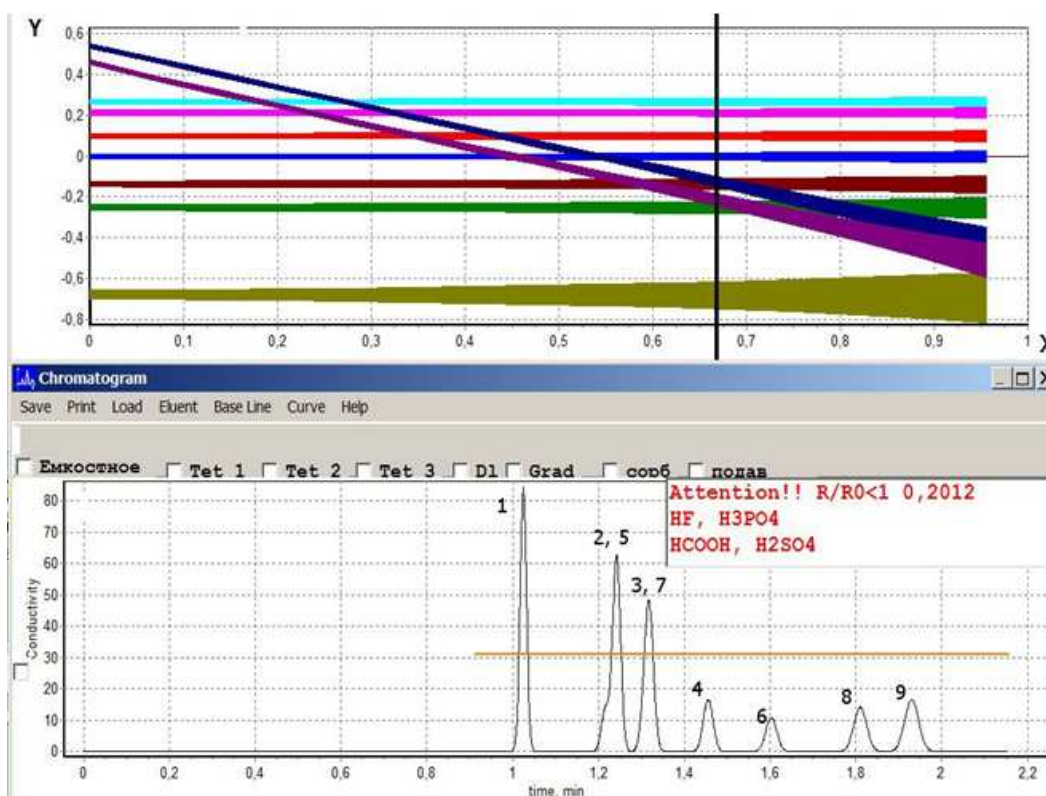


Рис. 3. Динамическая карта и хроматограмма с режимом анализа в запрещенной области, где пики 2, 5 и 3, 7 не разделены. Нумерация пиков та же, что и на рис. 1

6. Ищем возможные пути траектории на новой карте при $t' > t'_M$, $y > y_M$ и делаем очередной шаг начиная с п. 1:

$$X_{M+1} = X(t'_{M+1}), \quad y_{M+1} = \log \left[10^{y_M} + \frac{v}{L} \frac{(10^{X_M} + 10^{X_{M+1}})}{2} (t'_{M+1} - t'_M) \right].$$

Приведем пример построения допустимого режима разделения компонентов с помощью градиентной ДКХС для системы, представленной на рис. 1.

3. Применение градиентной ДКХС для нахождения допустимого режима анализа в запрещенной области изократической ДКХС. Одной из основных целей построения градиентной ДКХС является поиск оптимальных режимов хроматографического анализа. Существуют разные подходы к понятию оптимизации процесса хроматографии. Например, одним из критериев оптимизации является понятие пиковой емкости хроматограммы [11], поиск минимума которой (она равна нулю, когда между пиками нет свободных промежутков) соответствует цели повышения производительности хроматографии. Пиковая емкость не очень удобна для оптимизации, так как нулевой пиковой емкости достичь практически невозможно, а результат с ненулевой пиковой емкостью нуждается в дополнительных критериях. Более точным критерием является время однократного анализа при выполнении требований по разделению компонентов [7]. Именно этот критерий мы и будем использовать в настоящей работе. В работе [12] нами описан алгоритм градиентной оптимизации, основанный на допустимом усилении элюента после прохождения точки касания критичных компонентов (рис. 2).

Динамическая карта хроматографической системы и хроматограмма для представленного здесь градиентного режима получена при $pH = 9.5$, время удерживания последнего пика уменьшилось с 2.83 мин. при изократическом режиме до 2.52 мин. при градиентном.

Подобный метод оптимизации хотя и позволяет добиться уменьшения времени анализа, но ставит перед экспериментатором проблему регенерации колонки перед следующим анализом, так как состояние колонки в начале и в конце анализа различны.

Еще большего выигрыша времени анализа можно было бы добиться, если бы удалось получить разделение компонентов в запрещенной области, показанной на рис. 3.

На рис. 4. показано, как с помощью градиентной ДКХС можно “обойти” области пересечения полос и

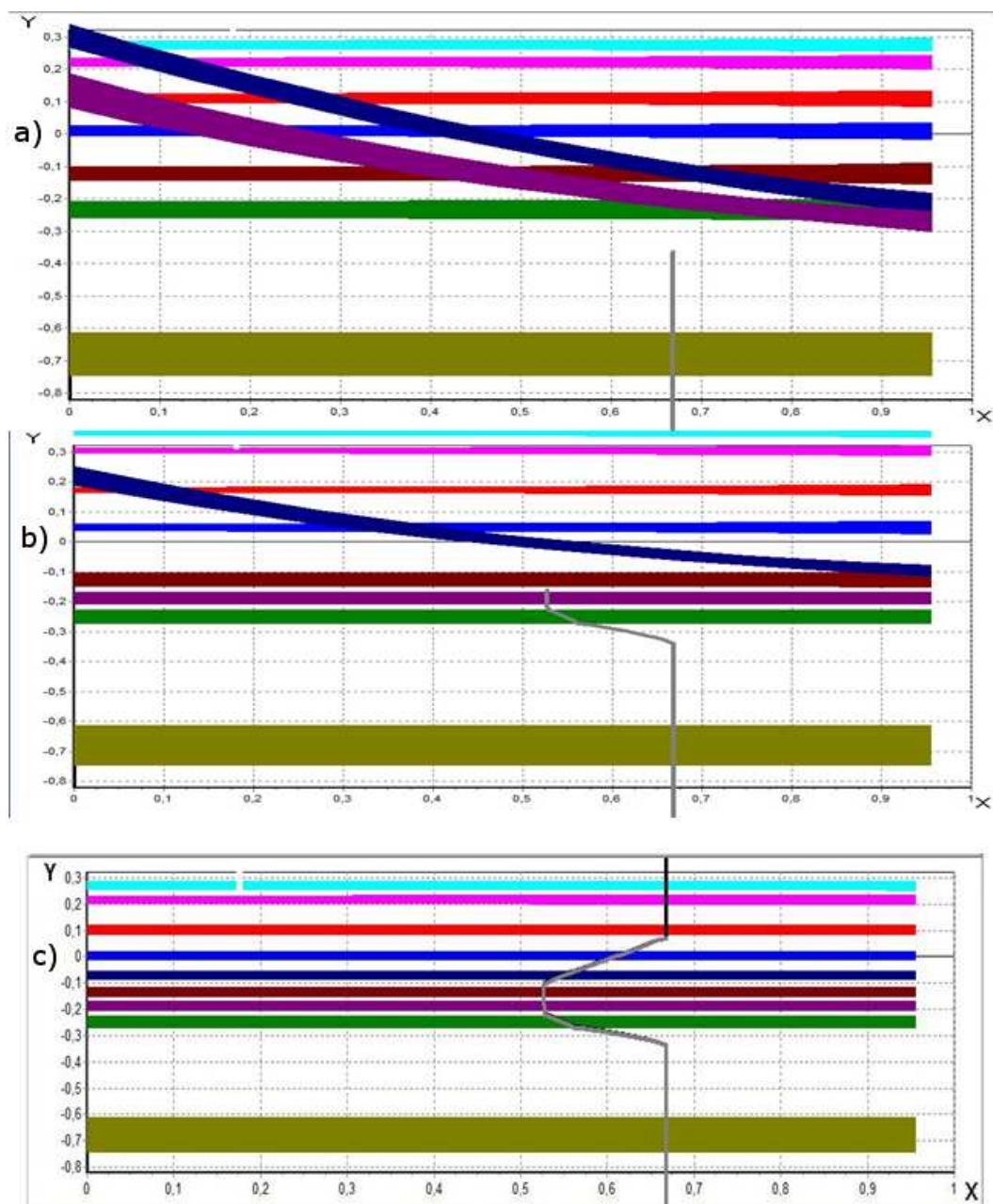


Рис. 4. Этапы а)–с) построения траектории с помощью градиентной ДКХС

добиться разрешения компонентов на хроматограмме (рис. 5). Режим переменного усиления и ослабления элюента для разделения компонентов в запрещенной области впервые был описан в работе [13], где он был найден путем длительного поиска на изократической ДКХС и условно назван *змейкой*. Как показывает рис. 4, градиентная ДКХС значительно облегчает поиск. Следует отметить, что преимущества режима типа змейка состоят не только в том, что он позволяет работать в запрещенной области и значительно сокращает время анализа, но еще и в том, что начало и конец траектории, а следовательно, и состав подвижной фазы, совпадают по величине X , так что последующей регенерации колонки перед следующим анализом не требуется.

Режимы типа змейка требуют точной настройки оборудования и могут быть найдены только с помощью модельных построений, так как экспериментальные поиски в запрещенной области затруднены.

4. Выводы. В настоящей статье намечены пути работы с переменными режимами ВЭЖХ с помощью построения градиентной карты хроматографической системы. Следует отметить, что реальный хроматографический процесс может иметь особенности, которые не учтены в простейшем представлении (5) и оценках (7) и (8). Тогда следует использовать общую теорию, данную нами в [10]. Для корректного по-

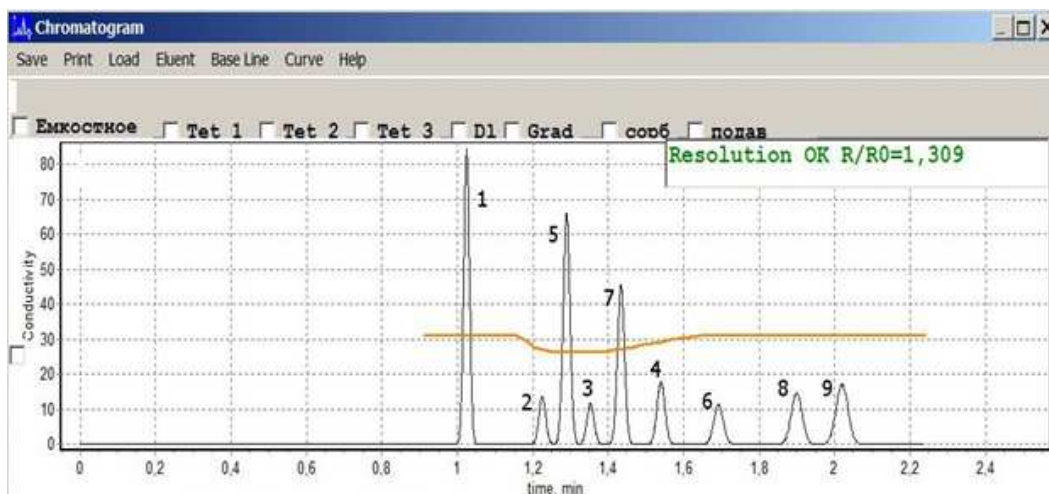


Рис. 5. Результирующая хроматограмма с хорошим разрешением всех компонентов.
Полное время анализа сокращено до 2.1 минут

строения карты требуется информация обо всех физико-химических взаимодействиях веществ в колонке, как в работе [7] для ионохроматографической системы. На основании данных [7] и была смоделирована ДКХС в настоящей статье. Расчеты проводились с помощью комплекса программ Ionchrom [14], моделирующего ионохроматографическую систему.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Poppe H., Paanakker J., Bronkhorst M.* Peak width in solvent-programmed chromatography: I. General description of peak broadening in solvent-programmed elution // *J. Chromatography A.* 1981. **204**. 77–84.
2. *Snyder L.R., Dolan J.W.* High-performance gradient elution (the practical application of the linear-solvent-strength model). Hoboken: Wiley, 2007.
3. *Madden J.E., Avdalovic N., Haddad P.R., et al.* Prediction of retention times for anions in linear gradient elution ion chromatography with hydroxide eluents using artificial neural networks // *J. Chromatogr. A.* 2001. **910**, N 1. 173–179.
4. *Nikitas P., Pappa-Louisi A., Balkatzopoulou P.* Theory of stepwise gradient elution in reversed-phase liquid chromatography coupled with flow rate variations: application to retention prediction and separation optimization of a set of amino acids // *Anal. Chem.* 2006. **78**. 5774–5782.
5. *Дейнека В.И.* Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // *Ж. физ. химии.* 2006. **80**, № 3. 511–516.
6. *Долгоносов А.М., Ипполитова О.Д.* Расчет и оптимизация хроматографического разделения смесей ионов // *Журн. аналит. химии.* 1993. **48**, № 8. 1361–1372.
7. *Долгоносов А.М., Сенявин М.М., Волощук И.Н.* Ионный обмен и ионная хроматография. М.: Наука, 1993.
8. *Долгоносов А.М., Прудковский А.Г.* Метод обратимых вариаций для оптимизации градиентной ионной хроматографии // *ДАН.* 2013. **449**, № 3. 295–299.
9. *Dionex Catalog* (www.dionex.com).
10. *Прудковский А.Г.* Метод моментов в применении к системе уравнений высокоэффективной колоночной хроматографии // *Математическое моделирование.* 2012. **24**, № 5. 81–96.
11. *Схунмакерс П.* Оптимизация селективности в хроматографии. М.: Мир, 1989.
12. *Прудковский А.Г.* Алгоритм оптимизации градиентного элюирования в ионной хроматографии // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2012. **12**, вып. 5. 635–649.
13. *Долгоносов А.М., Прудковский А.Г.* Метод обратимых вариаций для оптимизации градиентной ионной хроматографии // *ДАН.* 2013. **449**, № 3. 295–299.
14. *Прудковский А.Г., Долгоносов А.М.* Программа для моделирования ионной хроматографии IONCHROM. Роспатент: свид. № 2000610520 (РФ), выд. 19.06.2000.

Поступила в редакцию
10.07.2013