

## **7. Особенности эксплуатации колонок для ВЭЖХ**

Хроматографическая колонка является главным узлом хроматографической системы. При возникновении проблем с разделением часто бывает очень сложно определить, связаны ли они с самой колонкой или другими элементами хроматографической системы. Вместе с тем, причины проблем ищут в первую очередь в состоянии колонки, хотя в большинстве случаев эти проблемы вызваны другими факторами, например, изменениями состава подвижной фазы (ПФ), ее расхода, колебаниями температур в системе и окружающей среде, различием образцов и т.д. При возникновении проблем, приводящих к неисправности колонки, необходимо предпринять своевременные грамотные действия по устранению причин, чтобы избежать этого в будущем.

### **7.1. Подготовка растворителя и пробы**

Способ подготовки растворителя для ВЭЖХ зависит от того, какого качества растворитель имеется в наличии и для каких задач предполагается его использовать. Имеет значение также устойчивость растворителя к действию тепла, света и кислорода воздуха. Если используют растворители высокой чистоты, например, перегнанные в стеклянной аппаратуре, специально очищенные для ВЭЖХ и профильтрованные через фильтр с порами диаметром 0.5 мкм, их подготовка для работы проста: готовят смесь растворителей нужного состава, как правило, смешением по объему и дегазируют ее тем или иным способом. Если используют растворитель более низкого качества, в особенности технический, его подвергают нескольким дополнительным стадиям очистки: перегонке или ректификации в стеклянной аппаратуре, часто с предварительной химической обработкой, осушкой и с обязательным фильтрованием перед дегазацией через фильтр с порами

диаметром 0.2 – 0.5 мкм. Пригодность подготовленного растворителя проверяют непосредственно на хроматографе в диапазоне чувствительности и расходов, с которыми предстоит работать. Недостаточную чистоту растворителя устанавливают по шумам нулевой линии, превышающим допустимые, по большому дрейфу нулевой линии, по невозможности отрегулировать нулевое положение регистрирующего устройства на чувствительных шкалах детектора. Такая проверка особенно важна при работе в градиентном режиме, для которого необходимы растворители наиболее высокого качества.

Выделяющиеся из недеаэрированной ПФ пузырьки воздуха приводят к нестабильности нулевой линии детектора, ухудшают эффективность колонок для эксклюзионной хроматографии, заполненных полужесткими гелями, могут вызвать окисление лабильных соединений и некоторых привитых фаз. Поэтому необходима деаэрация ПФ. Ее проводят кипячением, продувкой гелием, воздействием вакуумом или ультразвуком.

### **Особенности работы с водными растворителями**

Вода и элюенты, готовящиеся на ее основе, нуждаются в особом внимательном отношении, так как вода очень легко загрязняется, поглощая газы и летучие вещества из воздуха лабораторного помещения. Некоторые водные растворы, особенно буферные фосфатные, являются питательной средой, в которой быстро размножаются многие бактерии, образуя частицы колоний. Эти частицы способны засорять фильтры, нарушать работу клапанов, портить колонки и т.д. Дегазированные водные растворы очень быстро поглощают кислород и воздуха. Следует, как правило, использовать для ВЭЖ свежеприготовленную бидистиллированную воду. Приготовив растворитель, следует дегазировать его, отфильтровать и затем быстро использовать.

Если растворитель стоял некоторое время, его нужно перед работой проверить его на отсутствие взвесей и опалесценции, профильтровать и дегазировать. Лучше всего готовить и использовать растворитель в количестве, необходимом на день работы.

### **Подготовка раствора пробы**

Раствор пробы, как правило, нужно готовить в том же растворителе, который используют для работы. Этот способ является наилучшим, так как не дает (или почти не дает) ложных пиков на хроматограмме, связанных с вытеснительными пиками, прохождением через детектор другого растворителя и откликом детектора на изменение при этом показателя преломления.

Если в пробе присутствуют нерастворимые примеси (соли, полимеры и др.), анализ которых не представляет интереса, такие пробы после растворения должны быть профильтрованы через фильтр с порами 0.2 – 0.5 мкм под вакуумом или, что более удобно, под давлением; можно отделять твердые частицы на центрифуге.

Если пробу не удастся приготовить из компонентов рабочего растворителя из-за плохой растворимости образца, следует попытаться подобрать растворители, используя литературные данные по растворимости или метод проб и ошибок. Важно, чтобы этот растворитель был совместим с ПФ. Когда растворитель выбран, всегда до того, как ввести приготовленный раствор пробы, сделайте холостой тестовый ввод такого же объема выбранного растворителя, но без растворенного образца. Это дает возможность оценить, какие ложные пики при вводе растворителя будут образовываться. Наконец, следует ввести раствор образца в этом растворителе. Если растворитель сильно отличается от того, который используют для элюирования, то кроме образования ложных пиков возможно выпадение части образца в осадок в колонке или

инжекторе, когда проба смешивается с элюентом. Иногда при смешивании таких разных растворителей существенно падает эффективность разделения или возможно даже исчезновение пиков компонентов пробы.

## 7.2. Типичные неисправности, способы обнаружения и устранения

В табл. 43 –47 приведены наиболее общие проблемы, приводящие к неисправности колонки, вместе с возможными причинами и способами их грамотного устранения. Обращаясь к данной таблице, вы сможете точно определить причину неисправности и устранить её. Если в системе слишком высокое давление, необходимо последовательно двигаясь от насоса к колонке, найти место засорения и устранить его.

**Таблица 43.** Проблема – существенное изменение времени удерживания одного и того же пика (более чем на 10%).

Возможная причина	Необходимые действия
1. Загрязнение колонки.	Промойте или замените колонку.
2. Потеря привитой фазы	Замените колонку
3. Колонка не уравновешена.	Промойте колонку подвижной фазой объемом не менее семи геометрических объемов колонки.
4. Колонка перегружена.	Уменьшите количество вводимого образца.
5. Изменился расход подвижной фазы	Проверить расход элюента
6. Изменился состав подвижной фазы	Заменить элюент
7. Изменилась температура	Проверить термостат

**Таблица 44.** Проблема – слишком высокое давление в системе

Возможная причина	Необходимые действия
1. Загрязнён входной фрит колонки.	Промойте колонку медленным обратным потоком подвижной фазы (в 5-6 раз меньшим, чем рабочий прямой поток) для удаления механических частиц или замените входной фрит.
2. Загрязнён фильтрующий элемент "in-line" фильтра (предколоночного фильтра) между инжектором и колонкой.	Замените фильтр.
3. Загрязнена предколонка.	Замените предколонку.
4. Используется колонка с малым внутренним диаметром.	Уменьшите расход подвижной фазы.
5. Колонка набита сорбентом с малым размером частиц.	Используйте более короткую колонку.
6. Неисправен манометр, тензопреобразователь	Проверьте давление другим манометром, замените указатель давления.
7. Загрязнено устройство ввода пробы	Промыть или заменить инжектор
8. Забит капилляр	Заменить капилляр
9. Загрязнена ячейка детектора.	Промыть ячейку детектора
10. Увеличилась объемная скорость	Проверить расход элюента

**Таблица 45.** Проблема – снижение эффективности колонки (числа теоретических тарелок)

Возможная причина	Необходимые действия
1. В колонке образовалось пустое пространство (проседание сорбента или образование канала).	Замените колонку.
2. "Износилась" предколонка.	Замените предколонку.
3. Экстраколоночные эффекты (повреждение или неправильная установка фитингов и соединений)	Минимизировать факторы, вызывающие эффекты, проверить и переустановить соединения
5. Увеличение объёма вводимого образца	Проверить систему или программу ввода образца
6. Растворение образца в другом, более сильном по элюирующей способности, чем подвижная фаза, растворителе	Изменить пробоподготовку
7. Изменения в составе подвижной фазы	Заменить подвижную фазу

### **7.3. Методические аспекты обеспечения высокой эффективности колонки**

Большинство пользователей хроматографических колонок хотели бы максимально продлить срок службы этого важнейшего элемента хроматографа. Рассмотрим три основные причины выхода из строя наиболее распространённого на сегодняшний день типа колонок - колонок, заполненных обращённо-фазовыми сорбентами.

Первая причина - *потеря химически привитой фазы*. В настоящее время около 90% всех анализов методом ВЭЖХ выполняются на химически привитых фазах. Разрушение химических связей между привитыми группами и силикагельной матрицей приводит к изменению времён удерживания и разрешения, а также к тому, что пики "хвостят". Причина - гидролиз силоксановых связей силикагелевой матрицы с привитыми группами или эндкэпирующим реагентом, применяемым для устранения влияния

**Таблица 46.** Проблема – раздвоение пиков, наличие «хвостов» у пиков

Возможная причина	Необходимые действия
1. Загрязнена колонка.	Промойте или замените колонку.
2. Входной фрит колонки забит механическими примесями.	Замените входной фрит колонки.
3. Потеря привитой фазы.	Замените колонку.
5. Проседание сорбента.	Замените колонку.
6. Образование канала в сорбенте.	Замените колонку.
7. Износилась предколонка.	Замените предколонку.
8. Экстраколоночные эффекты (повреждение или неправильная установка фитингов и соединений)	Минимизировать факторы, вызывающие эффекты, проверить и переустановить соединения
9. Колонка перегружена	Уменьшить объем вводимой пробы
10. Изменения состава подвижной фазы (концентрации буферного раствора, рН, количества ион-парного реагента и т.д.)	Замените подвижную фазу
11. Компоненты пробы выпадают в осадок	Изменить пробоподготовку, состав подвижной фазы
12. Изомеризация, диссоциация, таутомерные превращения компонентов пробы	Изменить состав подвижной фазы

остаточных силанольных групп на поверхности силикагеля. Гидролиз наиболее ярко выражен при использовании подвижных фаз с  $pH < 3$ . При использовании таких подвижных фаз следует использовать специально предназначенные для этого колонки (в том числе и с силикагельной матрицей), например, обращённо-фазовые колонки серии Luna фирмы Phenomenex. При работе вблизи нижней границы данного диапазона следует избегать повышения температур подвижной фазы выше 60 °С.

**Таблица 47.** Проблема – наличие неидентифицируемых («лишних») пиков

Возможная причина	Необходимые действия
1. Проба содержит примеси, не предусмотренные методикой анализа	Проверить калибровку, проанализировать стандартные образцы.
2. Загрязнена колонка.	Промойте или замените колонку.
3. Износилась предколонка.	Замените предколонку.
4. Загрязнен инжектор	Промойте инжектор
5. Загрязнена подвижная фаза	Замените элюент
6. Воздушные пузырьки в системе	Деаэрировать элюент

Вторая причина – образование пустого пространства на входе в колонку, вызванное проседанием сорбента. Это приводит к резкому снижению эффективности колонки (резкому уменьшению числа теоретических тарелок  $N$ ), а также ухудшению разрешения, увеличению размывания пиков, их расщеплению на дублеты и появлению "хвостов". Причинами проседания могут быть: а) повышенное (более допустимого) давление на входе в колонку или гидравлический удар (одна из наиболее часто встречающихся причин), вызванный резким сбросом давления; б) плохо набитые колонки, "проседающие" в процессе использования; в) в

результате использования подвижных фаз с высоким значением рН произошло растворение силикагеля в колонке. Для предотвращения этого следует поддерживать в системе давление, не превышающее 17-19 МПа. Не допускайте скачков давления. Помните, что при смене колонки или ПФ необходимо дождаться снижения давления до 1 – 1.5 Мпа и только после этого приступать к демонтажу колонки и промывке системы. При проседании сорбента колонки, вызванном гидравлическим ударом (сорбент на входе проседает обычно более чем на 1-2 мм), хроматографические параметры ухудшаются скачкообразно. В этом случае производитель (поставщик), как правило, не несет гарантийных обязательств, так как подобные действия являются грубейшим нарушением условий эксплуатации *любой* (не только обращенно-фазовой) колонки для жидкостной хроматографии. При использовании подвижной фазы с рН >7, её температура не должна превышать 40°C во избежание растворения силикагелевой матрицы. При необходимости применения щелочных подвижных фаз (рН >7) используйте специально предназначенные для этого силикагелевые колонки (обращенно-фазовые колонки серии Luna фирмы Phenomenex способны стабильно работать вплоть до рН=10) или же колонки на полимерной основе. Для остальных колонок рН подвижной фазы не должен превышать 7.

Третьей причиной неисправности колонки может стать очень прочное удерживание на привитой фазе отдельных компонентов пробы или подвижной фазы. Это приводит к ухудшению разрешения и изменению времён удерживания пиков. Это также может пагубно повлиять на форму пиков. Механические примеси и выпавшие в осадок компоненты пробы или соли буферных растворов также могут испортить колонку, забивая входной фрит или сорбент. Причины загрязнения колонки: а) проба содержит компоненты, не смываемые с колонки подвижной фазой данного состава. Это часто наблюдается при

использовании подвижных фаз с малым содержанием органического компонента; б) примеси в подвижной фазе адсорбируются на неподвижной фазе колонки. Это часто происходит при использовании ион-парных реагентов или других добавок в сочетании с подвижной фазой с малым содержанием органической составляющей и изократическим режимом элюирования; в) механические примеси в пробе или подвижной фазе, забивающие входной фритт колонки.

Для предупреждения этой ситуации, требуется очистка образца перед инъекцией, подразумевающая фильтрацию или центрифугирование пробы для удаления механических примесей и твердофазную экстракцию для удаления высоко удерживаемых компонентов пробы. Используйте только особо чистые растворители и реактивы для подвижной фазы и не забывайте фильтровать буферные растворы. По возможности откажитесь от применения ион-парных реагентов, в качестве ион-парных реагентов при работе на обращенной фазе не используйте вещества, содержащие в углеродных цепях более восьми атомов углерода (например, применение тетрадециламмоний бромида приводит к его необратимой сорбции на обращенной фазе). Для того чтобы смыть высоко удерживаемые примеси с неподвижной фазы колонки промойте её в течение продолжительного времени сильным растворителем (таким как 100% ацетонитрил). Поместите в линию между инжектором и колонкой предколонку, которая будет адсорбировать несмывающиеся компоненты и защищать аналитическую колонку. Не забывайте своевременно менять предколонки.

Правила эксплуатации нормально-фазовых колонок аналогичны изложенным в табл. 48. Они более требовательны к процедуре регенерации, колонки для НФХ так же не рекомендуется хранить в сухом виде.

Для продления службы аналитической колонки применяют так называемые предколонки. Основная роль, которую играет предколонка в

хроматографической системе – роль ловушки сильно удерживающихся на аналитической колонке примесей и механических частиц. Она устанавливается в линии между инжектором и аналитической колонкой. Защищая при помощи предколонки свою аналитическую колонку, можно существенно продлить срок ее службы. При этом важное значение имеет своевременная замена износившейся предколонки. Несмотря на то, что точно определить необходимость замены предколонки при работе с данным образцом и подвижной фазой можно лишь при наличии соответствующего опыта, существует несколько количественных параметров, способствующих принятию верного решения. Среди них – число теоретических тарелок  $N$ , рабочее давление  $P$  и разрешение  $R_s$ . Если  $N$ ,  $P$  или  $R_s$  изменились более чем на 10%, необходимо заменить предколонку.

**Таблица 48.** Правила эксплуатации обращенно-фазовой колонки

<p>Сводите к минимуму скачки давления в хроматографической системе</p>	<p>Ввод пробы осуществляйте резким поворотом ручки инжектора для снижения гидравлического удара. Обеспечьте наименьшую пульсацию насосов, вызванную, как правило, непостоянной объёмной скоростью подвижной фазы (фаза не дегазирована). Избегайте гидравлических ударов.</p>
<p>Используйте предколонку или "in-line" фильтр с диаметром пор 0.5 мкм.</p>	<p>Подсоедините их в линию между инжектором и аналитической колонкой. Фильтр задержит крупные механические частицы, а предколонка предотвратит попадание сильно удерживаемых примесей на аналитическую колонку.</p>

<p>Как можно чаще промывайте колонку сильным растворителем.</p>	<p>Обычно бывает достаточно промыть колонку 100% ацетонитрилом. Тем не менее, если необходим более сильный (менее полярный) растворитель, то можно применить метиленхлорид, являющийся одним из наиболее сильных растворителей в обращённо-фазовой хроматографии. При промывке помните о совместимости растворителей и возможности образования осадков. Многие сильные органические растворители не смешиваются с водными подвижными фазами и буферами, поэтому до и после использования метиленхлорида необходимо промыть колонку пропан-2-олом.</p>
<p>Перед вводом "грязной" пробы в колонку необходимо провести пробоподготовку для удаления механических частиц и сильно удерживающихся на колонке примесей.</p>	<p>В качестве пробоподготовки используйте такие приёмы, как твердофазная экстракция, фильтрация через пористый фильтр и центрифугирование</p>
<p>Колонки на силикагелевой основе используйте с подвижными фазами, рН которых лежит в диапазоне от 3 до 7.</p>	<p>Для работы за пределами данного диапазона используйте специально предназначенные для этого силикагелевые колонки или колонки на полимерной основе</p>
<p>При работе с буферными растворами используйте только свежеприготовленные буферы. Если это невозможно добавляйте в ёмкость 100 - 200 мг/л азид натрия для предотвращения роста бактерий.</p>	<p>Долго стоящие водные растворы быстро "зацветают", что приводит к нестабильности базовой линии и загрязнению колонки. Помните, что азид натрия очень ядовит и по токсичности сопоставим с цианидами.</p>
<p>Перед хранением или транспортировкой колонки отмойте её от солей и буферных растворов и оставьте в чистом ацетонитриле</p>	<p>Кроме того, ацетонитрил является хорошим растворителем для хранения, в отличие от водных и спиртовых смесей, способных ускорять гидролиз неподвижной фазы.</p>

Несмотря на то, что вышеперечисленные параметры являются достоверными критериями принятия решения о замене предколонки, нельзя быть на сто процентов уверенным в том, что предколонка должным образом защищает аналитическую колонку. Аналитическая колонка может загрязняться из-за перенасыщения предколонки и без видимого изменения вышеперечисленных параметров. Поэтому лучше произвести замену предколонки как можно раньше. В отсутствии иной информации хорошей привычкой является замена предколонки после 150 вводов пробы или 1000 объёмов подвижной фазы.

#### **7.4. Проблемы изменения селективности колонок**

При переходе на новую колонку могут возникнуть нежелательные эффекты ухудшения селективности. Изменения селективности колонки могут быть вызваны изменениями взаимодействия компонентов пробы с химически привитой фазой или силикагелевой матрицей сорбента. Удерживание зависит от длины химически привитых алкильных групп ( $C_{18}$ ,  $C_8$  и т.д.) и степени покрытия ими матрицы. Также возможны взаимодействия между компонентами пробы и активными силанольными центрами или примесями металлов на поверхности силикагелевой матрицы. Примеси металлов увеличивают кислотность силикагеля, в результате чего остаточные силанольные группы депротонируются даже при низких значениях pH и сильно взаимодействуют с основными веществами. Незначительные изменения матрицы могут вызвать кардинальные изменения селективности, а также формы пиков, в особенности у основных соединений.

Большие различия значений фактора разделения  $\alpha$  ( $>10\%$ ) для двух гидрофобных соединений, например, антрацена и нафталина указывают на различия привитой фазы. Большие различия селективности для

гидрофобного и полярного веществ основной природы (например, толуола и диметиланилина) указывают на различие свойств матрицы сорбента.

**Таблица 49.** Параметры, по которым контролируют изменения качества колонки

<p>Число теоретических тарелок, <math>N</math></p>	<p>Наиболее частыми причинами уменьшения числа теоретических тарелок являются образование полостей в колонке и её загрязнение. Пики на хроматограмме становятся шире, эффективность падает. Проверая число <math>N</math>, можно обнаружить проблемы ещё до того, как они повлияют на разделение.</p>
<p>Фактор удерживания, <math>k</math></p>	<p>Изменение фактора удерживания при одних и тех же условиях хроматографирования указывает либо на смывание химически привитой фазы с колонки, либо на загрязнение колонки несмываемыми примесями. Изменения <math>k</math> могут быть вызваны изменениями состава подвижной фазы, что часто приводит к ошибочному мнению о неисправности колонки.</p>
<p>Селективность, <math>\alpha</math>.</p>	<p>Изменение селективности является ещё одним свидетельством, наряду с фактором удерживания, смывания привитой фазы, загрязнения колонки или изменения состава подвижной фазы.</p>
<p>Коэффициент асимметрии, <math>A_s</math>.</p>	<p>Коэффициент асимметрии является мерой симметричности пика. Увеличение коэффициента асимметрии (появление "хвоста") пика указывает на возможное образование полости в колонке, но также может быть вызвано взаимодействием полярного образца с силанольными группами силикагеля в результате смывания привитой фазы.</p>
<p>Обратное давление колонки, <math>\Delta P</math></p>	<p>Увеличение обратного давления колонки указывает, как правило, на то, что входной фрит забился механическими частицами. Резкое увеличение обратного давления может быть также вызвано образованием полости в результате разрушения упаковки колонки.</p>

Возникновение проблем с селективностью в случае полярных слабоосновных и слабокислых веществ, как правило, вызвано некорректным вводом образца (образец растворен не в подвижной фазе, рН и ионная сила раствора не обеспечивают полного протонирования или депротонирования исследуемых компонентов и т.д.). В некоторых случаях изменение селективности связано с влиянием остаточных активных силанольных групп сорбента. Для его устранения следует установить рН подвижной фазы около 3 или добавить в элюент 10-50 мМ триэтиламина (ТЭА). Это позволит "закрыть" остаточные силанольные группы на поверхности силикагелевой матрицы. Все эти действия значительно улучшат воспроизводимость анализа при смене колонок для таких веществ. Оптимальным же решением в данном случае было бы использование специальных колонок со сверхочищенной силикагелевой матрицей и двойным покрытием функциональными группами (например, колонки Luna C18(2) или C8(2) фирмы Phenomenex), обеспечивающими уникальную воспроизводимость при анализе полярных соединений. Изменения селективности за счёт привитой фазы могут быть устранены при помощи варьирования силы элюента (содержания органического компонента).

#### **7.5. Проблемы воспроизводимости между параллельными вводами пробы**

Если время удерживания ( $T_R$ ) или разрешение ( $R_s$ ) пиков не воспроизводятся от анализа к анализу и даже ото дня ко дню, то точность данного ВЭЖХ метода не может считаться удовлетворительной. Плохая воспроизводимость вызвана, как правило, либо изменениями в условиях хроматографирования, либо изменением эффективности колонки. Проблемы с воспроизводимостью, вызванные изменением эффективности

колонки, выражаются обычно изменением удерживания или ухудшением симметрии пика. В табл. 8.12. приведены возможные характерные симптомы причин плохой воспроизводимости анализов, связанных с колоночными изменениями, а также наиболее вероятные и необходимые действия по их предотвращению. Несмотря на то, что приведённая в табл. 8.12 информация относится к хроматографическим системам как изократического, так и градиентного элюирования, при градиентном элюировании есть ряд дополнительных особенностей. Стандартная колонка 250x4.6 мм имеет внутренний объём приблизительно 2.5 мл и требует, по крайней мере, 10-15 объёмов подвижной фазы для достижения состояния равновесия. Это необходимо учитывать при составлении программы градиента. Самая распространённая ошибка заключается в том, что по окончании градиентного элюирования колонку либо забывают смыть сильной фазой, либо после смывки задают недостаточное время для достижения равновесия, необходимое для начала следующего анализа, либо то и другое наблюдается одновременно. При недостаточной скорости формирования градиента отдельные компоненты пробы могут накапливаться в колонке, постепенно загрязняя её. Например, если для анализа требуется градиент подвижной фазы с начальным содержанием органического модификатора 10% и конечным - 70%, то для того, чтобы смыть с колонки все компоненты пробы этого может быть недостаточно. Необходимо создать концентрацию 75 - 100%. Если колонка сильно загрязнена, то необходимо сначала промыть её обратным током с расходом в 5 раз меньшим рабочего. Отсоедините колонку от детектора, переверните её и вымойте из неё весь буферный раствор (если таковой использовался) водой. После этого перейдите на 100% органический растворитель. Наиболее приемлемым для этих целей является ацетонитрил, так как в обращённо-фазовой хроматографии он обладает большей элюирующей способностью, чем метанол.

**Таблица 50.** Причины плохой воспроизводимости

Изменения условий хроматографирования	Изменения эффективности колонки
Изменение подвижной фазы: <ul style="list-style-type: none"> <li>- рН</li> <li>- процент органического модификатора</li> <li>- концентрация буферного раствора</li> <li>- концентрация добавок (ион-парного реагента)</li> <li>- профиль градиента</li> </ul> Изменение температуры	Колонка неуравновешенна  Колонка перегружена  Загрязнение колонки
Изменение скорости потока	Потеря привитой фазы

Если этого оказалось недостаточно, перейдите на пропан-2-ол, который более эффективно растворяет многие белки, пептиды и жиры и является более сильным растворителем, чем ацетонитрил или даже ТГФ. При этом помните, что вязкость пропан-2-ола значительно выше, чем ацетонитрила и метанола, поэтому расход по сравнению с рабочим должен быть снижен не менее чем в 3-4 раза.

Плохая воспроизводимость параллельных вводов пробы может быть вызвана и плохой воспроизводимостью смешения компонентов ПФ. Данная причина относится исключительно к недостаткам конструкции ВЭЖХ систем. Для ее устранения следует помнить, что в ВЭЖХ системах с формированием градиента на линии высокого давления динамические миксеры обеспечивают значительно более высокую воспроизводимость смешения, чем статические смесители потока. Особенно сильно это проявляется при смешении растворителей сильно отличающихся по вязкости. В системах градиентного элюирования с формированием

градиента на линии низкого давления воспроизводимость смещения сильно зависит от степени дегазации компонентов и правильной работы соленоидных клапанов программатора градиента и геометрии камеры смещения.

### **7.6. Регенерация загрязненных колонок.**

Технически наиболее удобный метод разделения – изократическая ВЭЖХ. Если при этом подвижная фаза постоянного состава обладает недостаточной элюирующей силой для того, чтобы смыть сильно удерживающиеся (не анализируемые) компоненты пробы с колонки, они накапливаются на сорбенте, и эффективность колонки будет постепенно ухудшаться. Основными симптомами загрязнения колонки являются: увеличение перепада давления, изменение времён удерживания, широкие и «хвостящие» несимметричные пики, потеря разрешения.

Эффективность загрязнённой колонки может быть в большинстве случаев восстановлена путем продолжительной промывки сильным растворителем, например, 100% ацетонитрилом. Если это не помогает, то следуйте инструкциям по регенерации колонок, приведённым ниже.

#### **Регенерация обращённо-фазовых колонок с внутренним диаметром 4.6 мм:**

1. Подсоедините колонку к хроматографу в противоположном направлении.
2. Промойте колонку от буферных растворов и солей обратным током 25 мл воды со скоростью 0.2-0.3 мл/мин.
3. Промойте колонку 25 мл пропан-2-ола с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
4. Промойте колонку 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0.5 мл/мин.
5. Промойте колонку 25 мл гексана с расходом не более 0.5 мл/мин.

**Таблица 51.** Устранение плохой воспроизводимости по удерживанию

Причины плохой воспроизводимости	Симптомы	Необходимые действия
Колонка неуравновешенна	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Постоянное увеличение или уменьшение времён удерживания</li> <li>– Неправильная форма пика</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Уделяйте больше времени уравниванию колонки. Перед вводом пробы промойте колонку как минимум 15 объёмами подвижной фазы (35 мл для колонки 250 x 4.6 мм).</li> <li>2) Если для анализа необходим слабый элюент, промойте колонку сначала более сильным растворителем.</li> </ol>
Загрязнённая колонка.	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Продолжительное уменьшение времени удерживания</li> <li>– Неправильная форма пика</li> <li>– Увеличивающееся давление</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Промойте колонку обратным током сильным растворителем с расходом в 5 раз меньшим по сравнению с рабочим.</li> <li>2) Если промывка не помогает, замените колонку. В следующий раз используйте предколонку.</li> </ol>
Потеря привитой фазы	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Систематическое изменение (обычно уменьшение) времён удерживания</li> <li>– Неправильная форма пика</li> </ul>	<p>Замените колонку, если она больше не удовлетворяет вашим запросам. Используйте специальные колонки, стабильные в широком диапазоне pH.</p>
Перегрузка колонки	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Уменьшение времени удерживания при увеличении массы введённого образца</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Разбавьте пробу перед вводом.</li> <li>2) Подберите колонку с большим внутренним диаметром.</li> </ol>

6. Промойте колонку ещё раз 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0.5 мл/мин.
7. Промойте колонку ещё раз 25 мл пропан-2-ола с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
8. Подсоедините колонку в обычном направлении. Промойте колонку подвижной фазой, не содержащей буферный раствор, только после этого добавьте в подвижную фазу буферный раствор с рабочим расходом.
9. Приведите колонку в равновесие 25 – 50 мл подвижной фазы.
10. Введите пробу или стандарт, чтобы убедиться, что колонка регенерирована.

Для колонок меньшего диаметра соблюдайте пропорциональное снижение расходов.

#### **Регенерация нормально-фазовых колонок с внутренним диаметром 4.6 мм:**

1. Подсоедините колонку к хроматографу в противоположном направлении.
2. Промойте колонку обратным током 50 мл смеси метанол – хлороформ с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
3. Промойте колонку 50 мл этилацетата с расходом 0.5 мл/мин.
4. Подсоедините колонку в обычном направлении.
5. Приведите колонку в равновесие 50 мл подвижной фазы.
6. Введите пробу или стандарт, чтобы убедиться, что колонка регенерирована.

Для колонок меньшего диаметра также соблюдайте пропорциональное снижение расходов. В связи с меньшей вязкостью нормально-фазовых элюентов требования к низкому расходу растворителя менее жестко.