

АСQUITY UPLC 2 – ПЕРВАЯ АНАЛИТИЧЕСКАЯ СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ СИСТЕМА КЛАССА UPLC ОТ КОМПАНИИ WATERS

О.Покровский, ЗАО "ШАГ"

Дан краткий обзор возможностей и сфер применения нового прибора семейства Acquity компании Waters – аналитического сверхкритического флюидного хроматографа UPLC 2. Описаны преимущества аналитической сверхкритической флюидной хроматографии как техники, позволяющей вернуть нормально-фазовый режим разделения в ежедневную аналитическую практику.

Сверхкритический флюид – особое состояние вещества, в которое оно переходит по достижении определенной температуры и давления. Если взять вещество, которое в нормальных условиях является жидкостью или газом, поместить в герметичный сосуд, затем нагреть и одновременно сжать так, что плотности его газообразной и жидкой фаз сравняются, то это вещество перейдет в сверхкритическое флюидное состояние. В нем уже невозможно расслоение на две фазы, а плотность и другие физико-химические характеристики среды изменяются от жидкоподобных до газоподобных не скачкообразно, а непрерывно и плавно, например, путем варьирования давления или температуры. Такая субстанция, с одной стороны, подобно газу, обладает высокой проникающей способностью, низкой вязкостью, пренебрежимо малым поверхностным натяжением, а с другой, подобно жидкости, – сравнительно высокой плотностью и наличием растворяющей способности. Это сочетание свойств делает сверхкритические флюиды привлекательной средой для осуществления разнообразных транспортных химических процессов, в том числе сепарационных.

Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) – метод, родственный высокоэффективной жидкостной хроматографии, в котором в качестве подвижной фазы вместо жидкости используется смесь веществ, находящихся в сверх- или субкритическом состоянии. В современной СФХ в качестве основного компонента подвижной фазы чаще всего используется сверхкритический диоксид углерода (СК-CO_2). Это негорючее, нетоксичное, химически сравнительно инертное вещество с низкими критическими параметрами ($P_{\text{крит}} = 73 \text{ атм}$, $T_{\text{крит}} = 31^\circ\text{C}$). СК-CO_2 – неполярный растворитель, условно его растворяющая способность сопоставима с гексаном, бензолом, при повышенных давлениях – с дихлорметаном [1]. В нормальном состоянии – это газ, поэтому в препаративной сверхкритической флюидной хроматографии значительно снижена острота проблемы выделения очищенных аналитов из подвижной фазы, так как после проведения разделения и сброса давления большая часть подвижной фазы испаряется автоматически. В подавляющем большинстве случаев растворяющей способности чистого CO_2 недостаточно для проведения эффективного элюирования интересующих анали-

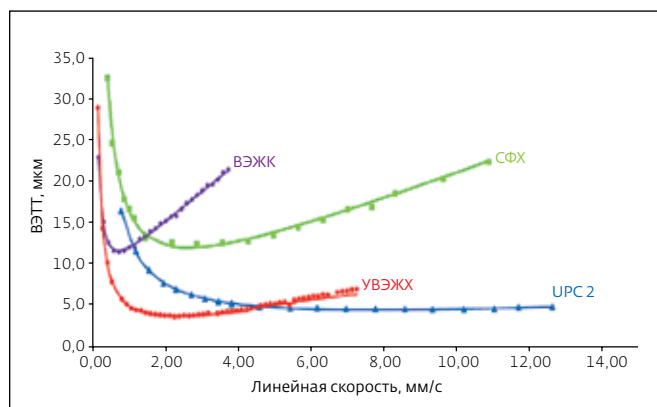


Рис.1. Сопоставление кривых Ван-Деемтера для ВЭЖХ и СФХ, УВЭЖХ и UPLC 2

тов, поэтому в СФХ широко используют полярные сорбители, прежде всего низшие спирты. Сочетание низкой вязкости, высокой проникающей способности сверхкритического флюида и высоких коэффициентов диффузии растворенных в нем веществ приводит к тому, что многие разделения в СФХ удается проводить со скоростью в 3-5 раз большей, чем в ВЭЖХ на таких же сорбентах при весьма умеренном перепаде давления через колонки. При этом эффективность разделения в СФХ часто выше, чем в аналогичных по

селективности разделениях, проводимых с помощью ВЭЖХ. Коэффициенты диффузии аналитов в растворах сверхкритических флюидов выше, чем в жидкостях, вязкость – ниже, изотермическая сжимаемость – намного выше, а поверхностное натяжение отсутствует. Вследствие этого массоперенос осуществляется быстрее, чем в жидких растворах, а сорбенты оказывают гораздо меньшее сопротивление массопереносу подвижной фазы. Как известно, эффективность элюирования, количественно определяемая в хроматографии числом теоретических тарелок либо высотой, эквивалентной одной теоретической тарелке (ВЭТТ), зависит от трех основных факторов: вихревой диффузии, продольной диффузии и сопротивления массопереносу. Первый фактор в грубом приближении (уравнение Ван-Деемтера) можно считать постоянным. Вклад второго фактора, продольной диффузии, в эффективность разделения очень быстро падает с ростом скорости потока. Вклад третьего фактора, сопротивления массопереносу, наоборот, растет. Коэффициент массопереноса прямо пропорционален квадрату диаметра частиц сорбента и обратно пропорционален коэффициенту диффузии аналита в подвижной фазе. На рис.1 приведены зависимости

высоты, эквивалентной теоретической тарелке, от линейной скорости потока подвижной фазы для ВЭЖХ и СФХ с 5-мкм сорбентами, а также для УВЭЖХ и UPLC 2 с суб-2-мкм сорбентами. Как видно, и в СФХ, и в UPLC 2 падение эффективности разделения (рост величины ВЭТТ) по мере повышения скорости потока происходит гораздо медленнее, что обуславливает возможность использования более высоких скоростей элюирования в данном методе по сравнению с ВЭЖХ и УВЭЖХ.

Распространение сверхкритической хроматографии происходило достаточно неравномерно. Первая работа по использованию сверхкритического флюида как подвижной фазы в хроматографии опубликована в 1962 году [3]. После первичного взлета интереса в 60-70-е годы 20 века развитие СФХ несколько замедлилось, что не в последнюю очередь связано с неоправданно завышенными ожиданиями вариабельности полярности сверхкритического диоксида углерода. На ранних этапах становления метода предполагалось, что при достаточно высоких давлениях растворяющая способность СК-СО₂ будет сравнима с таковой для изопропанола [4], а когда эти надежды не оправдались, наступило некоторое разочарование. Затем, на волне наступления "хиральной эры" в фармацевции и появления необходимости проводить энантиомерные разделения многих сотен кандидатов в фармпрепараты, интерес к сверхкритической



Рис.2. Acquity UPC 2 – первая аналитическая сверхкритическая хроматографическая система класса UPLC

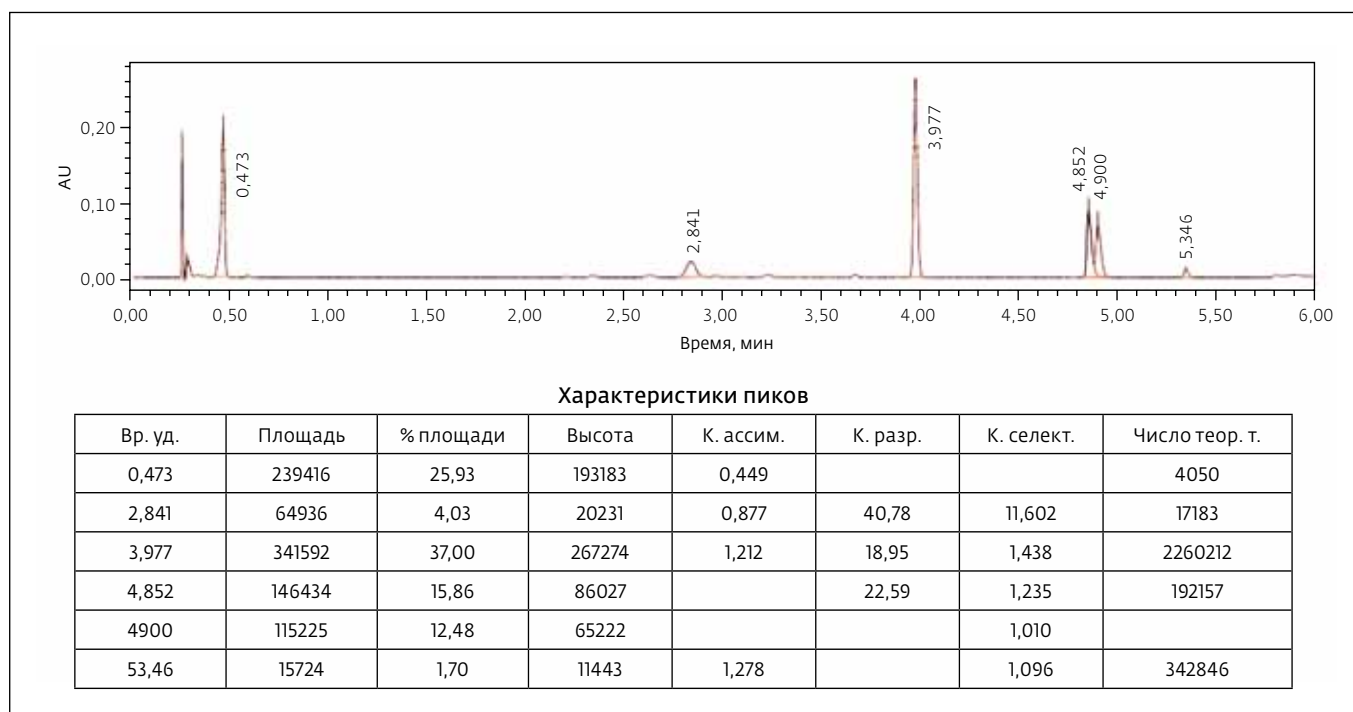


Рис.3. Разделение смеси эпимеров синтетического простагландина

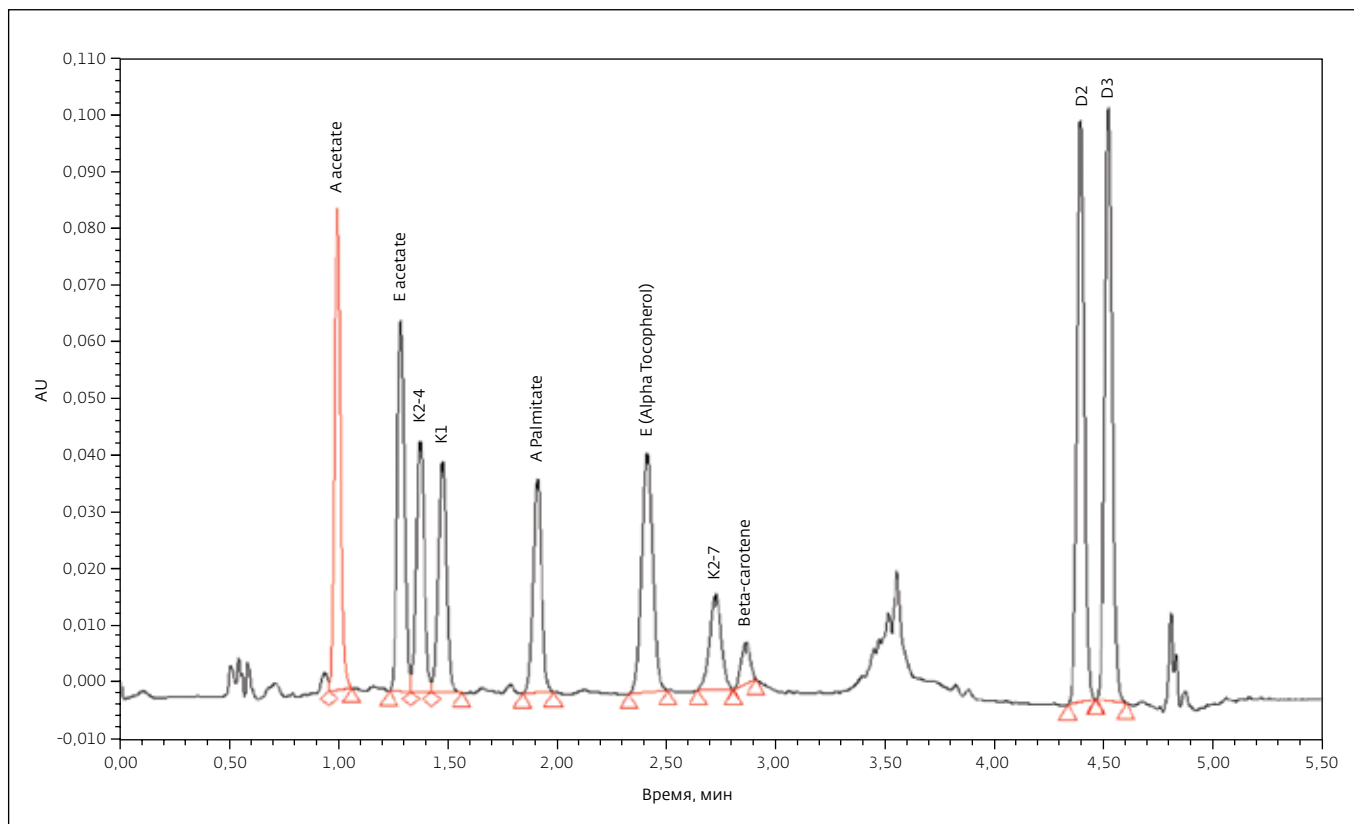


Рис.4. Анализ жирорастворимых витаминов с помощью Acquity UPC 2

хроматографии возродился вновь, но преимущественно был связан с препаративным вариантом техники СФХ как более быстрой и экономически привлекательной альтернативой хиральной препаративной ВЭЖХ. Аналитическая сверхкритическая хроматография при этом развивалась слабо, в основном ввиду отсутствия оборудования, соответствовавшего современным запросам хроматографистов-аналитиков. И лишь недавно с приходом в эту сферу гигантов индустрии хроматографического оборудования, прежде всего компании Waters, наступил перелом этой тенденции.

В 2012 году корпорация Waters выпустила на рынок новый прибор семейства Acquity – UPC 2 (Ultrapformance Convergence Chromatography) (рис.2). Это единственная в мире аналитическая хроматографическая система класса UPLC, специально созданная для работы со сверхкритическим диоксидом углерода в качестве основного компонента элюента. В данном приборе воплощены все достоинства оборудования для ультрапроизводительной хроматографии с суб-2-мкм сорбентами, разработанного компанией Waters с 2004 года, и преимущества сверхкритической флюидной хроматографии.

Благодаря сочетанию преимуществ суб-2-мкм сорбентов и транспортных свойств сверхкритиче-

ских флюидов в СФХ, можно добиться высоких значений эффективности за короткие времена удерживания. На рис.3 приведен пример разделения смеси эпимеров синтетического простагландина, в котором для некоторых компонентов смеси за 4 мин достигается эффективность разделения в 220000 теоретических тарелок.

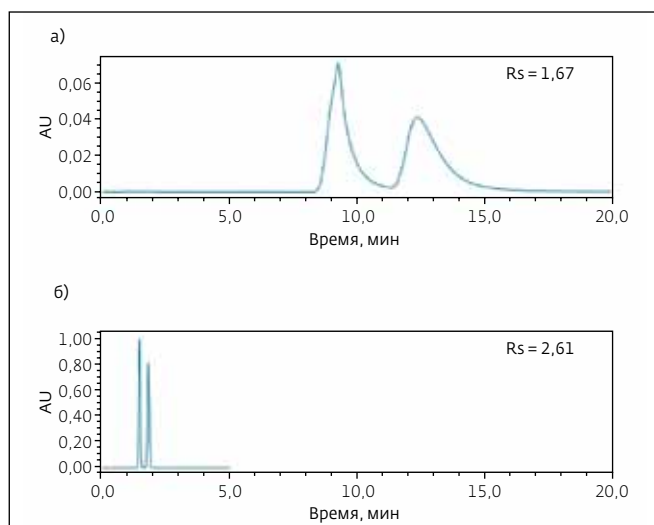


Рис.5. Разделение энантимеров биолога с помощью ВЭЖХ (а); СФХ на Acquity UPC 2 (б)



Рис.6. Acquity UPC 2 – золотой призер Pittcon 2012

Благодаря появлению оборудования для СФХ, отвечающего современным требованиям к аналитической хроматографии, в настоящий момент происходит ренессанс нормально-фазовой (НФ) хроматографии в аналитической практике. В отличие от традиционной НФ-ВЭЖХ, основанной на использовании углеводородных и хлоруглеводородных растворителей, для СФХ не характерны трудности с низкой воспроизводимостью методик и длительностью выхода хроматографической системы на равновесие при смене условий. СФХ успешно применяется для анализа как полярных низкомолекулярных субстанций, например, в фармации, так и липофильных соединений – триглицеридов, терпеноидов, жирорастворимых витаминов и многих других классов химических соединений. На рис.4 приведен пример анализа смеси жирорастворимых витаминов, в котором одновременно определены бета-каротин, витамины групп D, К и т.п.

Ввиду возможности использования различных типов сорбентов, обладающих специфической селективностью, а также благодаря управляемой растворяющей способности сверхкритического флюида СФХ отлично подходит для разделения смесей структурных изомеров – прежде всего

энантиомеров, но также и позиционных изомеров ароматических соединений, Z/E-изомеров и т.д. Преимущества СФХ, связанные с большими линейными скоростями подвижной фазы, особо актуальны для таких разделений. Поскольку близкие по химической структуре вещества обладают похожими сорбционными свойствами, то набрать необходимую разницу в удерживании между ними сложно, и, как правило, такие разделения занимают много времени. На рис.5 приведено сравнение разделений энантиомеров бинола на одном и том же сорбенте в СФХ на UPC 2 и в ВЭЖХ по методике фармакопеи США.

Все детекторы, используемые в ВЭЖХ, применимы и в сверхкритической хроматографии. Acquity UPC 2 может быть оснащен оптическим детектором, детектором светорассеяния, кроме того, данная система совместима со всей линейкой масс-спектрометров компании Waters от простых квадрупольных детекторов до tandemных масс-спектрометров, включая Xevo G2-S QToF и SYNAPT G2-S. Методы ионизации, применимые в СФХ, включают электроспрей, химическую и фотохимическую ионизацию.

Исторически в СФХ применяли те же сорбенты, что и в нормально-фазовой ВЭЖХ. В последнее время интенсивно развивается сфера специальных сорбентов для сверхкритической хроматографии [5]. В силу природы сверхкритического диоксида углерода и его смесей с низшими спиртами в СФХ, помимо собственно нормально-фазовых, возможно также осуществление и иных режимов разделения – неводных HILIC-подобных [6], ион-парных [7] и даже ионообменных [8]. Интенсивно развивающаяся область СФХ – использование методов динамического модифицирования для разделения смесей полярных и ионогенных компонентов – позволяет существенно расширить область применимости данной хроматографической техники. Компания Waters выпускает четыре специализированных типа сорбентов для аналитической сверхкритической хроматографии – чистый силикагель, изготавливаемый по технологии ВЕН (Bridged Ethylene Hybrid, гибридный органо-неорганический сорбент на основе силикагеля с этиленовыми мостиками [9]), силикагель с привитыми 2-этилпиридиновыми группами (ВЕН 2ЕР, один из самых популярных сорбентов в СФХ), сорбент на основе технологии СШ (Charged Surface Hybrid, гибридный сорбент с нанесенным зарядом) с привитыми перфторфенильными группами (СШ FР) и силикагель особой прочности с привитыми окта-

децильными группами (HSS C18). Такой набор различных по своей химической структуре сорбентов позволяет реализовывать большой спектр режимов разделения в СФХ и обеспечивает эффективность начальной оптимизации метода разделения смесей веществ неизвестной природы.

Acquity UPC 2 – это новое слово в аналитической хроматографии, это технология, в которой используются методы нормально-фазовой хроматографии на привычном современному аналитику уровне. Высочайший уровень данной разработки компании Waters подтвержден жюри выставки инструментов для химического анализа Pittcon 2012, на которой Acquity UPC 2 удостоился золотой медали (рис.6).

ЛИТЕРАТУРА

1. **C.L.Phelps, N.G.Smart, C.M.Wai.** Past, present, and possible future applications of supercritical fluid extraction technology. – Journal of Chemical Education, 1996, v.73, p.1163-1169.
2. **G.Guiochon, A.Tarafder.** Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography. – Journal of Chromatography A, 2011, v.1218, №8, p.1037-1114.
3. **E.Klesper, A.H.Corwin, D.A.Turner.** High pressure gas chromatography above critical temperatures. – Journal of Organic Chemistry, 1962, v.27, №2, p.700.
4. **J.C.Giddings, M.N.Myers, L.McLaren, R.A.Keller.** High pressure gas chromatography of nonvolatile species. – Science, 1968, v.162, p.67-73.
5. **C.F.Poole.** Stationary phases for packed-column supercritical fluid chromatography. – Journal of Chromatography A, 2012, v.1250, p.157-171.
6. **C.West, S.Khater, E.Lesellier.** Characterization and use of hydrophilic interaction liquid chromatography type stationary phases in supercritical fluid chromatography. – Journal of Chromatography A, 2012, v.1250, p.182-195.
7. **J.Zheng, L.T.Taylor, J.D.Pinkston.** Elution of cationic species with/without ion pair reagents from polar stationary phases via SFC. – Chromatographia, 2006, v.63, p.267.
8. **R.Pell, W.Lindner.** Potential of chiral anion-exchangers operated in various subcritical fluid chromatography modes for resolution of chiral acids. – Journal of Chromatography A, 2012, v.1245, p.175-182.
9. **K.D.Wyndham et al.** Characterization and evaluation of C18 HPLC stationary phases based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles. – Analytical Chemistry, 2003, v.75, p.6781-6788.

НОВЫЕ КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСТВА "ТЕХНОСФЕРА"



ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ

под ред. Ю-Винг Май, Жонг-Жен Ю

Техносфера, 2011. – 688с. ISBN 978-5-94836-203-8

*Издание осуществлено при финансовой поддержке
Федерального агентства по печати и массовым коммуникациям
в рамках Федеральной целевой программы «Культура России»*

Цена: 1188 р.

В книге приведен исчерпывающий обзор основных типов полимерных нанокompозитов. Часть I посвящена силикатам со слоистой структурой, рассмотрены их свойства: воспламеняемость и термостойкость, барьерные свойства, износостойкость и подверженность микробиологическому разрушению. В части II рассматриваются нанотрубки, наночастицы и неорганически-органические гибридные системы, анализируется их упругость и прочность, а также магнитные и светоиспускающие характеристики.

Благодаря известным редакторам и международному авторскому коллективу книга "Полимерные нанокompозиты" станет настольным справочником по этому важному новому типу материалов для руководителей групп исследователей и разработчиков в автомобилестроении и гражданском строительстве.

КАК ЗАКАЗАТЬ НАШИ КНИГИ?

☎ 125319 Москва, а/я 594; ☎ (495) 956-3346, 234-0110; knigi@technosphera.ru, sales@technosphera.ru