



# М И М И Р Х И М И И

Ллойд Р. Снайдер, Джозеф Дж. Киркленд,  
Джон У. Долан

## Введение в современную жидкостную хроматографию

Перевод с английского  
к.т.н. М.Б. Бару  
И.В. Важениной  
д.ф.-м.н. Е.А. Козловского  
к.х.н. И.А. Петухова  
О.А. Петуховой

Под общей редакцией  
к.т.н. М.Б. Бару  
И.В. Важениной  
д.х.н. С.М. Староверова

ТЕХНОСФЕРА  
Москва  
2020

УДК 543.544.5

ББК 24.58

C53

C53 Снайдер Ллойд Р., Киркленд Джозеф Дж., Долан Джон У.

Введение в современную жидкостную хроматографию

М.: ТЕХНОСФЕРА, 2020. – 960 с. + 17 с. цв. вкл.

ISBN 978-5-94836-600-5

Это третье издание книги «Введение в современную жидкостную хроматографию» – на сегодняшний день одно из самых популярных в мире справочных руководств по современной жидкостной хроматографии. Это и учебник, и справочник, и даже энциклопедия по всем (или почти по всем) вопросам, связанным с ВЭЖХ.

В книге освещено огромное количество вопросов, связанных с теорией хроматографии, современным оборудованием ВЭЖХ, методами детектирования и устройством детекторов, подробно рассмотрены теоретические и практические аспекты выбора неподвижных и подвижных фаз. Особое внимание уделено обращенно-фазовой, нормально-фазовой, гель-проникающей, гидрофобной, гидрофильной и другим видам хроматографии. Отдельные главы посвящены разделению синтетических и природных полимеров, препаративной хроматографии, разделению энантимеров, пробоподготовке, типовым проблемам при работе с хроматографическим оборудованием и, что особенно важно в современных условиях, валидации аналитических методов.

Книга предназначена для широкого круга специалистов, имеющих дело с современной жидкостной хроматографией. Она будет полезна как тем, кто только начинает знакомиться с жидкостной хроматографией, так и специалистам уже имеющим опыт работы в этой области.

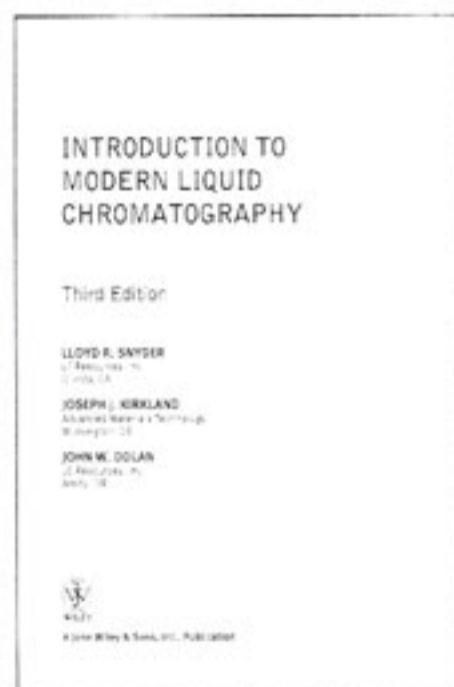
УДК 543.544.5

ББК 24.58

© 2010 by John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved

Все права защищены. Авторизованный перевод оригинального издания «Джон Вайли энд Санс Инк.»

© АО «РИЦ «ТЕХНОСФЕРА», перевод на русский язык, оригинал-макет, оформление, 2020



ISBN 978-5-94836-600-5

ISBN 978-0-470-16754-0 (англ.)

# СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие редакторов перевода . . . . .	29
Предисловие . . . . .	30
Словарь символов и принятых сокращений . . . . .	33
<b>Глава 1. Введение . . . . .</b>	<b>41</b>
1.1. Предварительные сведения . . . . .	42
1.1.1. Что такое ВЭЖХ? . . . . .	42
1.1.2. Каковы возможности ВЭЖХ? . . . . .	45
1.2. Небольшой экскурс в историю ВЭЖХ . . . . .	47
1.3. Некоторые альтернативы ВЭЖХ . . . . .	50
1.3.1. Газовая хроматография (ГХ) . . . . .	50
1.3.2. Тонкослойная хроматография (ТСХ) . . . . .	50
1.3.3. Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) . . . . .	50
1.3.4. Капиллярный электрофорез (КЭ) . . . . .	51
1.3.5. Противоточная хроматография (ПТХ) . . . . .	51
1.3.6. Специальные виды ВЭЖХ . . . . .	52
1.4. Другие источники информации о ВЭЖХ . . . . .	52
1.4.1. Книги . . . . .	52
1.4.2. Журналы . . . . .	54
1.4.3. Обзоры . . . . .	54
1.4.4. Краткие курсы . . . . .	54
1.4.5. Интернет . . . . .	54
Литература . . . . .	54
<b>Глава 2. Основные принципы и управление разделением . . . . .</b>	<b>56</b>
2.1. Введение . . . . .	57
2.2. Хроматографический процесс . . . . .	57
2.3. Удерживание . . . . .	61
2.3.1. Фактор удерживания $k$ и мертвое время колонки $t_0$ . . . . .	61
2.3.2. Роль условий разделения и состава образца . . . . .	65
2.3.2.1. Межмолекулярные взаимодействия . . . . .	67
2.3.2.2. Температура . . . . .	71
2.4. Ширина пика и число теоретических тарелок колонки $N$ . . . . .	71
2.4.1. Зависимость $N$ от условий разделения . . . . .	73
2.4.1.1. Процессы размывания пика, определяющие значения $N$ . . . . .	76
2.4.1.2. Несколько рекомендаций по выбору колонки . . . . .	82
2.4.2. Форма пика . . . . .	86
2.5. Разрешение и разработка метода . . . . .	89
2.5.1. Оптимизация фактора удерживания $k$ (член $a$ в уравнении (2.24)) . . . . .	93
2.5.2. Оптимизация селективности $\alpha$ (член $b$ в уравнении (2.24)) . . . . .	95
2.5.2.1. «Правильные» и «неправильные» образцы . . . . .	96
2.5.3. Оптимизация числа теоретических тарелок $N$ (член $v$ в уравнении (2.24)) . . . . .	97
2.5.3.1. Зависимость результатов разделения от параметров колонки . . . . .	97
2.5.3.2. Скоростная ВЭЖХ . . . . .	99
2.5.4. Разработка метода . . . . .	101
2.5.4.1. Оценка состава образца и целей разделения . . . . .	101
2.5.4.2. Пробоподготовка . . . . .	102

2.5.4.3. Выбор вида хроматографии . . . . .	102
2.5.4.4. Выбор детектора . . . . .	102
2.5.4.5. Выбор хроматографических условий . . . . .	102
2.5.4.6. Спрогнозировать, определить и решить возможные проблемы. . . . .	103
2.5.4.7. Валидация метода и пригодность системы. . . . .	104
2.6. Влияние количества пробы . . . . .	105
2.6.1. Перегрузка по объему: влияние объема образца на разделение . . . . .	105
2.6.2. Перегрузка по массе: влияние массы образца на разделение . . . . .	107
2.6.3. Как избежать проблем, связанных со слишком большим количеством образца . . . . .	108
2.6.3.1. Если концентрация образца больше ожидаемой . . . . .	109
2.6.3.2. Анализ следовых количеств вещества . . . . .	109
2.7. Смежные темы . . . . .	110
2.7.1. Уравновешивание колонки . . . . .	110
2.7.2. Градиентное элюирование . . . . .	110
2.7.3. Пиковая емкость и двумерное разделение. . . . .	111
2.7.4. Отслеживание пика . . . . .	112
2.7.5. Вторичные равновесия . . . . .	114
2.7.6. Переключение колонок . . . . .	115
2.7.7. Предварительная оценка удерживания по структуре анализируемого вещества . . . . .	116
2.7.7.1. Модель сольватационных параметров . . . . .	118
Литература . . . . .	119
<b>Глава 3. Оборудование . . . . .</b>	<b>122</b>
3.1. Введение. . . . .	124
3.2. Резервуары и фильтрование элюентов. . . . .	125
3.2.1. Устройство резервуара и его использование . . . . .	126
3.2.2. Фильтрование подвижной фазы . . . . .	127
3.3. Дегазация подвижной фазы . . . . .	128
3.3.1. Требования к дегазации . . . . .	128
3.3.2. Дегазирование гелием . . . . .	130
3.3.3. Вакуумное дегазирование и онлайн-дегазирование . . . . .	131
3.4. Капилляры и соединения (фитинги) . . . . .	132
3.4.1. Капилляры. . . . .	132
3.4.1.1. Капилляры для низкого давления . . . . .	132
3.4.1.2. Капилляры для высокого давления . . . . .	133
3.4.2. Фитинги . . . . .	136
3.4.2.1. Фитинги для низкого давления . . . . .	136
3.4.2.2. Фитинги для высокого давления . . . . .	138
3.4.2.3. Специализированные фитинги . . . . .	139
3.5. Насосные системы . . . . .	141
3.5.1. Возвратно-поступательные плунжерные насосы . . . . .	141
3.5.1.1. Двухплунжерные насосы . . . . .	145
3.5.1.2. Накопительные плунжерные насосы . . . . .	145
3.5.1.3. Активный клапан . . . . .	146
3.5.2. Смешивание в потоке . . . . .	146
3.5.2.1. Смешивание на стороне высокого давления . . . . .	147
3.5.2.2. Смешивание на стороне низкого давления . . . . .	148
3.5.2.3. Гибридные системы . . . . .	148
3.5.3. Градиентные системы. . . . .	149

3.5.4. Специальные методы	150
3.5.4.1. Методы, использующие малые (микро- и нано-) скорости потока	150
3.5.4.2. Методы, использующие высокие скорости потока (препаративные разделения)	150
3.5.4.3. Методы, использующие высокое давление	151
3.6. Автосамплеры	151
3.6.1. Шестиходовой кран ввода образца	151
3.6.1.1. Ввод из заполненной петли	152
3.6.1.2. Ввод из частично заполненной петли	152
3.6.2. Конструкция автосамплера	154
3.6.2.1. Автосамплеры с заполнением петли засасыванием	155
3.6.2.2. Автосамплеры с заполнением петли нагнетанием	156
3.6.2.3. Автосамплер со встроенным петлевым дозатором	156
3.6.3. Эффекты, связанные с количеством образца	158
3.6.3.1. Вводимый объем	158
3.6.3.2. Растворитель образца	159
3.6.4. Другие области применения кранов	160
3.6.4.1. Переключение колонок	160
3.6.4.2. Коллекторы фракций	162
3.6.4.3. Направление в слив	162
3.7. Колоночные термостаты	163
3.7.1. Требования к температурному контролю	163
3.7.2. Устройство термостатов	164
3.7.2.1. Нагревательные термостаты	164
3.7.2.2. Воздушные термостаты	164
3.7.2.3. Термостаты с элементами Пельтье	164
3.8. Управляющие модули	165
3.8.1. Сопровождение эксперимента	166
3.8.2. Управление системой	167
3.8.3. Сбор данных	167
3.8.4. Обработка данных	168
3.8.5. Создание отчета	168
3.8.6. Регулирующие функции	169
3.9. Влияние внеколоночных объемов	169
3.10. Обслуживание	170
3.10.1. Тест на работоспособность/пригодность системы	170
3.10.1.1. Установочная, операционная и эксплуатационная квалификации	170
3.10.1.2. Градиентное тестирование	171
3.10.1.3. Дополнительная проверка системы	174
3.10.2. Профилактика	177
3.10.2.1. Периодическое обслуживание	177
3.10.2.2. Рекомендации для рутинных методов	180
3.10.3. Ремонтные работы	182
3.10.3.1. Персонал	182
3.10.3.2. Ведение учета	182
3.10.3.3. Специальные рекомендации по ремонту	183
Литература	184

Глава 4. Детектирование	185
4.1. Введение	186
4.2. Характеристики детектора	187
4.2.1. Общие положения	187
4.2.2. Способы детектирования	189
4.2.2.1. Детектирование, основанное на измерении общей характеристики вещества	189
4.2.2.2. Детектирование, основанное на измерении специфических характеристик образца	190
4.2.2.3. Детектирование с помощью модификации подвижной фазы	190
4.2.2.4. Детектирование «независимыми» приборами	190
4.2.3. Сигнал, шум, дрейф и точность измерений	191
4.2.3.1. Шум и дрейф	191
4.2.3.2. Отношение сигнал/шум (S/N)	194
4.2.4. Пределы обнаружения	196
4.2.5. Линейность	198
4.3. Общее предисловие к различным типам детекторов	198
4.4. Детекторы, регистрирующие поглощение в УФ- и видимой областях спектра света	198
4.4.1. Детекторы с фиксированной длиной волны	201
4.4.2. Детекторы с переменной длиной волны	202
4.4.3. Диодно-матричные детекторы	203
4.4.4. Общие характеристики УФ-детекторов	205
4.5. Флуоресцентные детекторы	206
4.6. Электрохимические (амперометрические) детекторы	209
4.7. Детекторы радиоактивности	211
4.8. Кондуктометрические детекторы	212
4.9. Хемилюминесцентный азотный детектор	213
4.10. Хиральные детекторы	215
4.11. Рефрактометрические детекторы	216
4.12. Детекторы светорассеяния (ИДС)	219
4.12.1. Испарительный детектор светорассеяния	220
4.12.2. Детектор светорассеяния на центрах (ядрах) конденсации (ДСЦК)	222
4.12.3. Лазерные детекторы светорассеяния (ЛДС)	222
4.13. Детектор заряженных аэрозолей	223
4.14. Масс-спектрометрические детекторы (МС)	224
4.14.1. Интерфейсы МС-детекторов (способы ионизации образца)	225
4.14.1.1. Ионизация электрораспылением (ИЭ)	225
4.14.1.2. Химическая ионизация при атмосферном давлении (ХИАД)	226
4.14.1.3. Другие модификации интерфейса МС-детекторов	227
4.14.1.4. Соображения относительно скорости потока	227
4.14.2. Квадруполь и ионные ловушки	227
4.14.3. Другие виды МС-детекторов	229
4.15. Другие «независимые» детекторы	230
4.15.1. Инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием (ИКФП)	230
4.15.2. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)	231
4.16. Дериватизация образца и реакционные детекторы	233
Литература	235
Глава 5. Колонки	237
5.1. Введение	238
5.2. Носители	238
5.2.1. Характеристики частиц	239

5.2.1.1. Типы частиц . . . . .	239
5.2.1.2. Размер частиц и диаметр пор . . . . .	241
5.2.2. Носители на основе силикагеля . . . . .	242
5.2.2.1. Эффективность колонки . . . . .	244
5.2.2.2. Структура поверхности силикагеля . . . . .	246
5.2.2.3. Подготовка частиц . . . . .	248
5.2.3. Пористые полимеры. . . . .	249
5.2.4. Монолитные сорбенты. . . . .	250
5.2.4.1. Монолиты на основе силикагеля. . . . .	251
5.2.4.2. Монолиты на полимерной основе. . . . .	251
5.2.5. Другие неорганические частицы. . . . .	252
5.2.5.1. Оксид циркония . . . . .	253
5.2.5.2. Оксиды алюминия и титана . . . . .	254
5.2.5.3. Графитированный углерод . . . . .	254
5.3. Неподвижные фазы . . . . .	255
5.3.1. «Привитые» неподвижные фазы . . . . .	256
5.3.2. Другие органические неподвижные фазы . . . . .	260
5.3.2.1. Нанесенные полимеры . . . . .	260
5.3.2.2. Гибридные частицы . . . . .	260
5.3.2.3. Колонки для подвижных фаз с высоким содержанием воды . . . . .	261
5.3.3. Колонки с различными функциональными группами сорбента. . . . .	262
5.4. Селективность колонки . . . . .	263
5.4.1. Основы селективности обращенно-фазовой колонки . . . . .	264
5.4.1.1. Взаимодействия анализируемого вещества с сорбентом. . . . .	266
5.4.1.2. Селективность по форме молекулы . . . . .	269
5.4.2. Воспроизводимость характеристик колонки и «эквивалентные» колонки . . . . .	272
5.4.3. Ортогональное разделение . . . . .	273
5.4.4. В каких еще случаях нужно знать селективность колонки . . . . .	273
5.4.4.1. Размывание заднего фронта пика . . . . .	274
5.4.4.2. Несмачиваемость неподвижной фазы . . . . .	274
5.4.4.3. Снижение эффективности сорбента . . . . .	274
5.5. Типоразмеры колонок . . . . .	275
5.5.1. Фитинги . . . . .	275
5.5.2. Типоразмеры колонок . . . . .	276
5.6. Методы упаковки колонок . . . . .	277
5.6.1. Сухая упаковка . . . . .	277
5.6.2. Суспензионная упаковка жестких частиц . . . . .	277
5.6.2.1. Выбор растворителя для приготовления суспензии . . . . .	278
5.6.2.2. Жесткие полимерные частицы . . . . .	280
5.6.3. Упаковка мягких гелей. . . . .	281
5.7. Спецификации колонок . . . . .	281
5.7.1. Стандарты производителя . . . . .	281
5.7.2. Число теоретических тарелок колонки . . . . .	282
5.8. Обслуживание колонок. . . . .	283
Литература . . . . .	287
<b>Глава 6. Обращенно-фазовая хроматография нейтральных образцов . . . . .</b>	<b>289</b>
6.1. Введение . . . . .	290
6.1.1. Краткая история обращенно-фазовой хроматографии. . . . .	292

6.2. Удерживание	292
6.2.1. Сила растворителя	294
6.2.2. Механизм удерживания в ОФХ	296
6.3. Селективность	300
6.3.1. Зависимость селективности от силы растворителя	300
6.3.2. Зависимость селективности от типа растворителя	303
6.3.3. Зависимость селективности от температуры	306
6.3.3.1. Последующий анализ	309
6.3.4. Селективность колонки	310
6.3.5. Разделения изомеров	311
6.3.5.1. Повышенная селективность при разделении изомеров	312
6.3.5.2. Зависимость селективности от формы молекулы	313
6.3.6. Другие соображения, касающиеся селективности	314
6.3.6.1. Эквивалентное разделение	314
6.3.6.2. Ортогональное разделение	318
6.4. Разработка метода и стратегия оптимизации селективности	319
6.4.1. Оптимизация нескольких параметров	321
6.4.1.1. Смеси различных органических растворителей	322
6.4.1.2. Одновременное изменение элюирующей силы и типа растворителя	325
6.4.1.3. Одновременное изменение элюирующей силы и температуры растворителя	325
6.4.1.4. Замена колонки с одновременным изменением одного или более условий	328
6.4.2. Оптимизация условий изменением параметров колонки	329
6.5. Неводная обращенно-фазовая хроматография (НОФХ)	331
6.6. Специфические проблемы	331
6.6.1. Слабое удерживание образцов с высокой полярностью	332
6.6.2. Уширение заднего фронта пика	333
Литература	333
<b>Глава 7. Ионные образцы: обращенно-фазовая, ион-парная и ионообменная хроматография</b>	<b>336</b>
7.1. Введение	337
7.2. Кислотно-основные равновесия и удерживание в обращенно-фазовой хроматографии	337
7.2.1. Выбор буферов	344
7.2.1.1. $pK_a$ и емкость буфера	344
7.2.1.2. Другие свойства буфера	347
7.2.1.3. Какие буферы лучше использовать	349
7.2.2. Как $pK_a$ зависит от структуры соединения	349
7.2.3. Влияние органических растворителей и температуры на pH подвижной фазы и значения $pK_a$ образца	350
7.2.3.1. Влияние %В органического растворителя на эффективное значение $pK_a$ вещества	351
7.2.3.2. Влияние температуры на значения $pK_a$	352
7.3. Разделение ионных образцов методом обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ)	352
7.3.1. Как контролировать удерживание	352
7.3.2. Как контролировать селективность	353

7.3.2.1. pH подвижной фазы . . . . .	353
7.3.2.2. Сила растворителя (%V) и температура . . . . .	355
7.3.2.3. Тип растворителя . . . . .	356
7.3.2.4. Тип колонки. . . . .	356
7.3.2.5. Другие условия, которые могут влиять на селективность. . . . .	359
7.3.3. Разработка метода . . . . .	359
7.3.3.1. Начальные условия (этап 1) . . . . .	360
7.3.3.2. Оптимизация селективности (этап 3). . . . .	361
7.3.4. Нестандартные проблемы. . . . .	361
7.3.4.1. Чувствительность к pH . . . . .	361
7.3.4.2. Влияние силанольных групп . . . . .	362
7.3.4.3. Слабое удерживание образца. . . . .	364
7.3.4.4. Чувствительность к температуре . . . . .	364
7.4. Ион-парная хроматография (ИПХ) . . . . .	364
7.4.1. Основы удерживания . . . . .	366
7.4.1.1. pH и образование ионной пары . . . . .	367
7.4.1.2. Ион-парный реагент: тип и концентрация . . . . .	367
7.4.1.3. Одновременное изменение pH и концентрации ион-парного реагента (ИПР) . . . . .	370
7.4.2. Разработка метода . . . . .	371
7.4.2.1. Выбор начальных условий (этап 1) . . . . .	372
7.4.2.2. Управление селективностью (этап 3). . . . .	375
7.4.2.3. Выводы. . . . .	378
7.4.3. Нестандартные проблемы. . . . .	378
7.4.3.1. Ложные пики . . . . .	379
7.4.3.2. Медленное уравнивание колонки . . . . .	379
7.4.3.3. Искажение формы пиков . . . . .	380
7.5. Ионообменная хроматография (ИОХ) . . . . .	380
7.5.1. Основы удерживания . . . . .	382
7.5.2. Роль противоиона . . . . .	384
7.5.3. pH подвижной фазы. . . . .	385
7.5.4. Колонки для ИОХ . . . . .	385
7.5.5. Роль других условий. . . . .	386
7.5.6. Разработка метода . . . . .	386
7.5.7. Разделение углеводов . . . . .	387
7.5.8. Разделения в смешанном режиме. . . . .	387
Литература . . . . .	389
<b>Глава 8. Нормально-фазовая хроматография . . . . .</b>	<b>391</b>
8.1. Введение . . . . .	392
8.2. Удерживание . . . . .	393
8.2.1. Теория. . . . .	396
8.2.2. Зависимость силы растворителя от V-растворителя и от %V. . . . .	400
8.2.3. Использование данных ТСХ для предсказания удерживания в НФХ. . . . .	403
8.3. Селективность . . . . .	406
8.3.1. Зависимость селективности от элюирующей силы растворителя . . . . .	406
8.3.2. Зависимость селективности от типа растворителя. . . . .	406
8.3.3. Зависимость селективности от температуры . . . . .	406
8.3.4. Селективность колонки . . . . .	411



8.3.5. Разделения изомеров . . . . .	413
8.4. Рекомендации по разработке метода . . . . .	416
8.4.1. Начальные условия для разработки НФХ-метода: выбор элюирующей силы подвижной фазы и типа сорбента (шаги 1, 2; таблица 8.2) . . . . .	418
8.4.2. Стратегии оптимизации селективности (шаг 3; таблица 8.2) . . . . .	420
8.4.3. Пример разработки НФХ-метода . . . . .	420
8.5. Трудности, возникающие при использовании НФХ . . . . .	422
8.5.1. Плохая воспроизводимость разделения . . . . .	422
8.5.2. Обеднение элюента растворителем и медленное уравнивание колонок . . . . .	424
8.5.3. Уширение задних фронтов пиков . . . . .	424
8.6. Хроматография гидрофильных взаимодействий (ГИХ) . . . . .	425
8.6.1. Механизм удерживания . . . . .	426
8.6.2. Колонки . . . . .	427
8.6.3. Разработка метода ГИХ . . . . .	429
8.6.4. Трудности, связанные с ГИХ . . . . .	431
Литература . . . . .	431
<b>Глава 9. Градиентное элюирование . . . . .</b>	<b>433</b>
9.1. Введение . . . . .	434
9.1.1. Причины для использования градиентного элюирования . . . . .	435
9.1.2. Форма градиента . . . . .	437
9.1.3. Сходство изократического и градиентного элюирования . . . . .	438
9.1.3.1. Модель линейного изменения элюирующей силы растворителя (ЛИС) . . . . .	439
9.1.3.2. Перемещение зон при градиентном элюировании . . . . .	440
9.2. Экспериментальные условия и их влияние на разделение . . . . .	441
9.2.1. Влияние изменения параметров колонки . . . . .	444
9.2.2. Влияние изменения градиента . . . . .	447
9.2.2.1. Исходный %В . . . . .	447
9.2.2.2. Конечный %В . . . . .	449
9.2.2.3. Задержка градиента . . . . .	450
9.2.2.4. Приборный объем задержки . . . . .	452
9.2.2.5. Кусочно-линейные градиенты . . . . .	454
9.2.3. «Неправильные» образцы . . . . .	456
9.2.4. Количественные соотношения . . . . .	458
9.2.4.1. Время удерживания . . . . .	459
9.2.4.2. Измерение величин $S$ и $k_w$ . . . . .	460
9.2.4.3. Ширина пика . . . . .	461
9.2.4.4. Разрешение . . . . .	462
9.3. Разработка метода . . . . .	462
9.3.1. Первичное градиентное разделение . . . . .	463
9.3.1.1. Выбор между градиентным и изократическим элюированиями . . . . .	465
9.3.1.2. Возможные проблемы . . . . .	468
9.3.2. Оптимизация $k^*$ (этап 4 таблицы 9.2) . . . . .	469
9.3.3. Оптимизация селективности градиента $\alpha^*$ (этап 5 таблицы 9.2) . . . . .	470
9.3.4. Оптимизация диапазона градиента (этап 6 таблицы 9.2) . . . . .	470
9.3.5. Ступенчатые (нелинейные) градиенты (продолжение этапа 6 таблицы 9.2) . . . . .	472

9.3.6. Оптимизация числа теоретических тарелок $N^*$ (этап 7 таблицы 9.2) . . .	473
9.3.7. Определение необходимого времени уравнивания колонки (этап 8 таблицы 9.2) . . . . .	473
9.3.8. Воспроизводимость метода . . . . .	476
9.3.8.1. Разработка метода . . . . .	477
9.3.8.2. Рутинные анализы . . . . .	477
9.3.9. Пиковая емкость и экспресс-разделения . . . . .	478
9.3.9.1. Оптимизированная пиковая емкость . . . . .	480
9.3.9.2. Экспресс-разделения . . . . .	483
9.3.10. Комплексная двумерная ВЭЖХ (в соавторстве с Питером Шонмейкерсом) . . . . .	485
9.3.10.1. Концепция ЖХ/ЖХ . . . . .	485
9.3.10.2. Пиковая емкость . . . . .	488
9.3.10.3. Оборудование для ЖХ/ЖХ . . . . .	488
9.3.10.4. Разработка метода для ЖХ/ЖХ . . . . .	489
9.4. Разделение крупных молекул . . . . .	491
9.5. Другие виды разделения . . . . .	492
9.5.1. Теория . . . . .	492
9.5.2. Нормально-фазовая хроматография . . . . .	493
9.5.3. Гидрофильная хроматография (ГИХ) . . . . .	493
9.5.3.1. Прикладные задачи . . . . .	494
9.5.3.2. Условия разделения . . . . .	496
9.5.4. Ионообменная хроматография (ИОХ) . . . . .	496
9.6. Проблемы . . . . .	496
9.6.1. Обоеднение растворителем . . . . .	496
9.6.2. Системные пики . . . . .	497
9.6.3. Дрейф базовой линии . . . . .	497
Литература . . . . .	497
<b>Глава 10. Разработка метода с помощью программного обеспечения . . . . .</b>	<b>500</b>
10.1. Введение . . . . .	501
10.1.1. Основы и история компьютерного моделирования . . . . .	503
10.1.2. Когда использовать компьютерное моделирование . . . . .	504
10.1.2.1. Преимущества . . . . .	505
10.1.2.2. Недостатки . . . . .	505
10.2. Программное обеспечение компьютерного моделирования . . . . .	506
10.2.1. Работа с программой DryLab . . . . .	507
10.2.2. Оптимизация градиента . . . . .	509
10.2.3. Другие возможности . . . . .	511
10.2.3.1. Прогнозирование изократического элюирования на основе данных градиентного элюирования . . . . .	511
10.2.3.2. Выбор определенного пика . . . . .	512
10.2.3.3. Изменение других условий . . . . .	512
10.2.3.4. Компьютерный подбор наилучшего кусочно-линейного градиента . . . . .	512
10.2.3.5. Уширение заднего фронта пика . . . . .	514
10.2.3.6. Метод двух разделений для улучшения разрешения образца .	514
10.2.3.7. Примеры использования компьютерного моделирования при разработке метода . . . . .	514
10.2.4. Отслеживание пиков . . . . .	515

10.2.5. Источники коммерчески доступного программного обеспечения для компьютерного моделирования хроматографических разделений . . . . .	516
10.3. Другое программное обеспечение для разработки метода . . . . .	516
10.3.1. Удерживание анализируемого вещества и его молекулярная структура . . . . .	517
10.3.2. Величины $k'_D$ анализируемого вещества и его молекулярная структура . . . . .	517
10.3.3. Селективность ОФХ-колонки . . . . .	517
10.3.4. Экспертные системы для разработки метода . . . . .	518
10.4. Компьютерное моделирование и разработка метода . . . . .	518
10.4.1. Пример 1: разделение смеси производных лизергиновой кислоты . . . . .	518
10.4.2. Пример 2: альтернативная стратегия разработки метода . . . . .	520
10.4.3. Проверка устойчивости метода . . . . .	522
10.4.4. Заключение . . . . .	523
Литература . . . . .	523
<b>Глава 11. Качественный и количественный анализ . . . . .</b>	<b>525</b>
11.1. Введение . . . . .	526
11.2. Измерение сигнала . . . . .	526
11.2.1. Принцип работы интегратора . . . . .	527
11.2.1.1. Сбор данных . . . . .	527
11.2.1.2. Распознавание пика . . . . .	530
11.2.1.3. Интегрирование неидеальных хроматограмм . . . . .	530
11.2.1.4. Обычные ошибки интегрирования . . . . .	532
11.2.1.5. Дополнительные советы . . . . .	533
11.2.2. Удерживание . . . . .	534
11.2.3. Размер пика . . . . .	535
11.2.4. Источники ошибок . . . . .	535
11.2.4.1. Отбор проб и пробоподготовка . . . . .	536
11.2.4.2. Хроматографическое разделение . . . . .	536
11.2.4.3. Детектирование . . . . .	536
11.2.4.4. Измерение пика . . . . .	537
11.2.4.5. Калибровка . . . . .	537
11.2.5. Пределы обнаружения и определения . . . . .	539
11.2.5.1. Предел обнаружения (ПО) . . . . .	540
11.2.5.2. Нижний предел количественного определения (НПКО или ПКО) . . . . .	542
11.2.5.3. Верхний предел . . . . .	542
11.2.5.4. Образцы с концентрациями, лежащими вне пределов метода . . . . .	543
11.3. Качественный анализ . . . . .	544
11.3.1. Время удерживания . . . . .	544
11.3.2. Качественный анализ в реальном времени . . . . .	545
11.3.2.1. УФ-детекторы . . . . .	546
11.3.2.2. Жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) . . . . .	546
11.3.2.3. ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием (ИКФП) . . . . .	547
11.3.2.4. Жидкостная хроматография с детектором ядерного магнитного резонанса (ЖХ-ЯМР) . . . . .	547
11.3.2.5. Хемилюминесцентный азотный детектор (ХЛАД) . . . . .	547
11.3.2.6. Лазерный детектор светорассеяния (ЛДС) . . . . .	547

11.3.2.7. Хиральные детекторы . . . . .	547
11.3.2.8. Качественный анализ в автономном режиме (оффлайн анализ) . . . . .	548
11.4. Количественный анализ . . . . .	548
11.4.1. Калибровка . . . . .	548
11.4.1.1. Калибровка внешним стандартом . . . . .	549
11.4.1.2. Калибровка внутренним стандартом . . . . .	552
11.4.1.3. Нормирование площадей пиков . . . . .	554
11.4.1.4. Метод стандартных добавок . . . . .	555
11.4.1.5. Оценка калибровочных кривых . . . . .	556
11.4.2. Анализ следовых количеств . . . . .	558
11.5. Выводы . . . . .	558
Литература . . . . .	559
<b>Глава 12. Валидация метода (совместно с Майклом Шварцем) . . . . .</b>	<b>560</b>
12.1. Введение . . . . .	562
12.2. Термины и определения . . . . .	565
12.2.1. Правильность . . . . .	566
12.2.2. Прецизионность . . . . .	568
12.2.2.1. Повторяемость . . . . .	568
12.2.2.2. Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность . . . . .	568
12.2.2.3. Воспроизводимость . . . . .	569
12.2.2.4. Надежность . . . . .	569
12.2.3. Специфичность . . . . .	569
12.2.4. Предел обнаружения и предел количественного определения . . . . .	569
12.2.5. Линейность и аналитическая область . . . . .	571
12.2.6. Устойчивость . . . . .	572
12.3. Пригодность системы . . . . .	573
12.4. Документация . . . . .	575
12.4.1. Валидационный протокол . . . . .	575
12.4.2. Метод испытания . . . . .	576
12.4.3. Валидационный отчет . . . . .	577
12.5. Валидация для различных типов фармацевтических методов . . . . .	578
12.5.1. Методы категории 1 . . . . .	578
12.5.2. Методы категории 2 . . . . .	578
12.5.3. Методы категории 3 . . . . .	579
12.5.4. Методы категории 4 . . . . .	580
12.6. Биоаналитические методы . . . . .	580
12.6.1. Подготовка стандартного образца . . . . .	581
12.6.2. Разработка и валидация биоаналитического метода . . . . .	581
12.6.2.1. Избирательность . . . . .	582
12.6.2.2. Правильность, прецизионность и степень извлечения . . . . .	582
12.6.2.3. Калибровочные/стандартные кривые . . . . .	583
12.6.2.4. Стабильность биоаналитического образца . . . . .	584
12.6.3. Рутинное применение биоаналитического метода . . . . .	585
12.6.4. Документирование биоаналитического метода . . . . .	586
12.7. Передача (трансфер) методики анализа в принимающую лабораторию (ТМА) . . . . .	587
12.7.1. Опции передачи (трансфера) методики анализа . . . . .	588
12.7.1.1. Сравнительное тестирование . . . . .	588
12.7.1.2. Совместная валидация . . . . .	589

12.7.1.3. Валидация и/или повторная валидация метода . . . . .	589
12.7.1.4. Отказ от оформления передачи метода испытания . . . . .	589
12.7.2. Основы ТМА . . . . .	590
12.7.2.1. Предварительно утвержденный протокол плана тестирования . . . . .	590
12.7.2.2. Описание метода / процедуры испытаний . . . . .	590
12.7.2.3. Описание и обоснование требований к тестам . . . . .	592
12.7.2.4. Критерии приемлемости . . . . .	592
12.7.2.5. Документирование результатов . . . . .	593
12.7.3. Потенциальные ошибки при ТМА . . . . .	593
12.7.3.1. Оценка оборудования . . . . .	594
12.7.3.2. Колонки ВЭЖХ . . . . .	594
12.7.3.3. Обучение оператора . . . . .	594
12.8. Корректировка методики или модификация методики . . . . .	595
12.8.1. Корректировка pH . . . . .	597
12.8.2. Концентрация соли в буфере . . . . .	597
12.8.3. Соотношение компонентов в подвижной фазе . . . . .	597
12.8.4. Длина волны УФ/ВИД фотометрического детектора . . . . .	598
12.8.5. Корректировка температуры . . . . .	598
12.8.6. Изменение длины и диаметра колонки, размера частиц сорбента . . . . .	598
12.9. Контроль качества и обеспечение качества . . . . .	599
12.9.1. Контроль качества . . . . .	599
12.9.2. Обеспечение качества . . . . .	599
12.10. Выводы . . . . .	600
Литература . . . . .	601
<b>Глава 13. Разделение биополимеров и синтетических полимеров (совместно с Тимоти Вером, Карлом Сканделлой и Петером Шонмейкерсом) . . . . .</b>	<b>602</b>
13.1. Биомакромоллекулы . . . . .	605
13.2. Молекулярная структура и конформация . . . . .	605
13.2.1. Пептиды и белки (полипептиды) . . . . .	606
13.2.1.1. Первичная структура . . . . .	606
13.2.1.2. Вторичная структура . . . . .	606
13.2.1.3. Третичная и четвертичная структуры . . . . .	606
13.2.1.4. Посттрансляционные модификации . . . . .	609
13.2.2. Нуклеиновые кислоты . . . . .	609
13.2.2.1. Одноцепочечные нуклеиновые кислоты . . . . .	609
13.2.2.2. Двухцепочечные нуклеиновые кислоты . . . . .	609
13.2.3. Углеводы . . . . .	610
13.2.4. Вирусы . . . . .	612
13.3. Особенности ВЭЖХ биомолекул . . . . .	614
13.3.1. Характеристики колонок . . . . .	614
13.3.1.1. Размер пор . . . . .	614
13.3.1.2. Размер частиц . . . . .	615
13.3.1.3. Характеристики и стабильность носителя . . . . .	617
13.3.1.4. Выход и биологическая активность . . . . .	618
13.3.2. Влияние структуры белка на его поведение при хроматографическом разделении . . . . .	618
13.4. Разделение пептидов и белков . . . . .	619
13.4.1. Обращенно-фазовая хроматография (ОФХ) . . . . .	619

13.4.1.1.	Выбор колонки . . . . .	620
13.4.1.2.	Выбор подвижной фазы . . . . .	621
13.4.1.3.	Температура . . . . .	624
13.4.1.4.	Градиентное элюирование . . . . .	625
13.4.1.5.	Влияние конформации полипептида . . . . .	628
13.4.1.6.	Капиллярные колонки и наноисточники ионизации . . . . .	630
13.4.1.7.	Разработка метода ОФХ . . . . .	631
13.4.2.	Ионообменная хроматография (ИОХ) и смежные методы . . . . .	633
13.4.2.1.	Выбор колонки . . . . .	636
13.4.2.2.	Выбор подвижной фазы . . . . .	638
13.4.2.3.	Хроматофокусирование . . . . .	639
13.4.2.4.	Хроматография на гидроксипатите . . . . .	640
13.4.2.5.	Аффинная хроматография на сорбентах с иммобилизованными металлами (АХИМ) . . . . .	641
13.4.3.	Хроматография гидрофобных взаимодействий (ХГВ) . . . . .	645
13.4.3.1.	Сорбенты и лиганды для ХГВ . . . . .	646
13.4.3.2.	Другие условия . . . . .	647
13.4.4.	Хроматография гидрофильных взаимодействий (ГИХ) . . . . .	648
13.4.4.1.	Неподвижные фазы, используемые в ГИХ . . . . .	650
13.4.4.2.	Подвижные фазы для ГИХ . . . . .	650
13.4.4.3.	Применение ГИХ в разделении пептидов и белков . . . . .	650
13.4.4.4.	Хроматография гидрофильных взаимодействий с электростатическим отталкиванием (ГИХЭО) . . . . .	651
13.4.5.	Многомерная жидкостная хроматография (МЖХ) в протеомике . . . . .	652
13.4.5.1.	Использование коллектора фракций . . . . .	653
13.4.5.2.	Непосредственно соединенные колонки для МЖХ . . . . .	654
13.4.5.3.	МЖХ с переключением колонок . . . . .	654
13.5.	Разделение нуклеиновых кислот . . . . .	655
13.5.1.	Анионообменная хроматография . . . . .	655
13.5.2.	Обращенно-фазовая хроматография . . . . .	657
13.5.2.1.	Олигонуклеотиды . . . . .	657
13.5.2.2.	Фрагменты, полученные рестрикцией, и продукты ПЦР . . . . .	658
13.5.2.3.	Денатурирующая ВЭЖХ . . . . .	658
13.5.2.4.	ОФХ-5 хроматография . . . . .	660
13.5.3.	Хроматография гидрофобных взаимодействий . . . . .	661
13.6.	Разделение углеводов . . . . .	662
13.6.1.	Хроматография гидрофильных взаимодействий . . . . .	662
13.6.2.	Распределительная хроматография с управляемой ионами селективностью . . . . .	663
13.6.3.	Высокоэффективная анионообменная хроматография . . . . .	665
13.7.	Разделение вирусов . . . . .	667
13.8.	Эксклюзионная хроматография (ЭХ) . . . . .	668
13.8.1.	Процесс разделения в ЭХ . . . . .	669
13.8.2.	Колонки для ЭХ . . . . .	671
13.8.2.1.	Сорбенты . . . . .	672
13.8.2.2.	Размер пор и пористость . . . . .	673
13.8.2.3.	Диаметр частиц . . . . .	673
13.8.2.4.	Увеличение разрешения в ЭХ . . . . .	674
13.8.3.	Подвижные фазы для ЭХ . . . . .	674
13.8.4.	Соображения по эксплуатации . . . . .	675

13.8.4.1. Емкость колонки	675
13.8.4.2. Использование денатурирующих условий	675
13.8.4.3. Калибровка колонки	676
13.8.4.4. Использование неидеальных условий разделения	676
13.8.5. Преимущества и недостатки ЭХ	676
13.8.6. Применение ЭХ	677
13.8.6.1. Аналитические приложения	678
13.8.6.2. Препаративные приложения	679
13.9. Крупномасштабная очистка биомакромолекул	680
13.9.1. История вопроса	680
13.9.2. Очистка рекомбинантного инсулина человека в промышленном масштабе	681
13.9.2.1. Цели очистки	681
13.9.2.2. Неподвижные фазы	682
13.9.2.3. Упаковка колонки	682
13.9.2.4. Стабильность продукта и колонки	682
13.9.2.5. Состав подвижной фазы	682
13.9.2.6. Разделение	682
13.9.2.7. Регенерация колонки	684
13.9.2.8. Очистка в лабораторном масштабе	685
13.9.2.9. Масштабирование	685
13.9.2.10. Очистка в промышленных масштабах	686
13.9.3. Общие требования к препаративной очистке с использованием ЖХ	687
13.10. Синтетические полимеры	688
13.10.1. Базовые понятия и принципы	688
13.10.2. Приемы анализа полимеров	691
13.10.3. Методы жидкостной хроматографии для анализа полимеров	692
13.10.3.1. Гель-проникающая хроматография (ГПХ)	692
13.10.3.2. Интерактивная жидкостная хроматография	692
13.10.3.3. Жидкостная хроматография в критических условиях	695
13.10.3.4. Другие методы	695
13.10.3.5. Химический состав как функция размера молекулы	696
13.10.4. Разделение полимеров с помощью двумерной хроматографии	697
Литература	698

#### Глава 14. Разделение энантиомеров

( <i>Михаэль Лэммерхофер, Норберт М. Майер, Вольфганг Линднер</i> )	703
14.1. Введение	704
14.2. Основы и определения	704
14.2.1. Изомерия и хиральность	705
14.2.2. Хиральное распознавание и разделение энантиомеров	707
14.3. Косвенный метод	708
14.4. Прямой метод	712
14.4.1. Метод хиральных добавок к подвижной фазе (ХДПФ) или аддитивный метод	712
14.4.2. Использование хиральной неподвижной фазы (ХНФ)	715
14.4.3. Принципы хирального распознавания	716
14.4.3.1. «Модель трехточечного присоединения»	716
14.4.3.2. Влияние подвижной фазы	718
14.5. Дисперсия и уширение задних фронтов пиков	719

14.6. Хиральные неподвижные фазы и их характеристики	719
14.6.1. ХНФ на основе полисахаридов	720
14.6.2. Синтетические полимерные ХНФ	727
14.6.3. ХНФ на основе белков	731
14.6.4. ХНФ на основе циклодекстрина	735
14.6.5. ХНФ на основе макроциклических антибиотиков	738
14.6.6. ХНФ на основе хиральных краун-эфиров	744
14.6.7. Донорно-акцепторные ХНФ	746
14.6.8. Хиральные ионообменники	749
14.6.9. Лигандообменные ХНФ. Хиральная лигандообменная хроматография (ХЛОХ)	752
14.7. Термодинамические аспекты	754
14.7.1. Термодинамика ассоциации анализируемого вещества с селектором	754
14.7.2. Термодинамика прямого хроматографического разделения энантиомеров	755
14.7.3. Термодинамика гетерогенной хиральной поверхности	755
Литература	757
<b>Глава 15. Препаративные разделения (совместно с Джозефом Коксом)</b>	762
15.1. Введение	763
15.1.1. Перегрузка колонки и последствия этого	763
15.1.2. Масштаб разделения	764
15.1.2.1. Колонки большого диаметра	765
15.1.2.2. Оптимизированные условия для преп-ЖХ	765
15.1.2.3. Другие соображения	767
15.2. Оборудование для преп-ЖХ-разделения	767
15.2.1. Колонки	768
15.2.2. Введение образца	769
15.2.2.1. Инжекторы с петлей ввода	769
15.2.2.2. Насосный ввод	770
15.2.3. Детекторы	771
15.2.3.1. УФ-детекторы	771
15.2.3.2. Другие детекторы	771
15.2.4. Сбор фракций	772
15.2.5. Выделение продукта (удаление подвижной фазы)	773
15.3. Изократическое элюирование	775
15.3.1. Количество образца и разделение	775
15.3.1.1. Изотермы сорбции	775
15.3.1.2. Ширина пика при разделениях малых количеств образцов в сравнении с шириной пика при разделениях больших количеств образцов	777
15.3.2. Разделение по методу соприкасающихся пиков	777
15.3.2.1. Емкость насыщения колонки	779
15.3.2.2. Перегрузка по объему образца	780
15.3.2.3. Растворимость образца	781
15.3.2.4. Разработка метода	783
15.3.2.5. Сбор фракций	785
15.4. Значительно перегруженное разделение	786
15.4.1. Полнота извлечения или чистота	786
15.4.2. Разработка метода	786

15.4.2.1. Эффективность колонки	788
15.4.2.2. «Пересечение изотерм»	788
15.5. Градиентное длюирование	790
15.5.1. Сравнение изократической и градиентной преп-ЖХ	791
15.5.2. Разработка метода для градиентной преп-ЖХ	792
15.6. Промышленное разделение	795
Литература	796
<b>Глава 16. Пробоподготовка (в соавторстве с Рональдом Мэджером)</b>	797
16.1. Введение	799
16.2. Виды образцов	800
16.3. Предварительная обработка твердых и полутвердых образцов	803
16.3.1. Измельчение образцов	803
16.3.2. Высушивание образцов	804
16.3.3. Фильтрование	804
16.4. Подготовка жидких образцов	805
16.5. Экстракция в системе жидкость — жидкость	806
16.5.1. Теория	806
16.5.2. Практика	808
16.5.3. Трудности	810
16.5.3.1. Образование эмульсии	810
16.5.3.2. Адсорбция растворенного вещества	810
16.5.3.3. Связывание растворенного вещества	811
16.5.3.4. Взаимная растворимость фаз	811
16.5.4. Специальные подходы к ЖЖЭ	811
16.5.4.1. Микроэкстракция	811
16.5.4.2. Микроэкстракция методом одной капли (МОК)	811
16.5.4.3. ЖЖЭ на твердой фазе (ТФЖЖЭ)	812
16.5.4.4. Жидкостная экстракция на иммобилизованном носителе (ИЖЭ)	812
16.6. Твердофазная экстракция (ТФЭ)	812
16.6.1. Сравнение ТФЭ и ВЭЖХ	813
16.6.2. Применение ТФЭ	814
16.6.2.1. Удаление примесей	815
16.6.2.2. Обогащение образца	815
16.6.2.3. Обессоливание	815
16.6.2.4. Другие применения	815
16.6.3. Приспособления для проведения ТФЭ	816
16.6.3.1. Картриджи	816
16.6.3.2. Диски	816
16.6.3.3. Другие приспособления для ТФЭ	817
16.6.4. Устройство для ТФЭ	819
16.6.5. Разработка метода для ТФЭ	820
16.6.5.1. Этапы ТФЭ	821
16.6.5.2. Сорбенты для ТФЭ	823
16.6.6. Пример разработки ТФЭ-метода: выделение альбутерола из плазмы крови человека	826
16.6.7. Специальные виды ТФЭ	827
16.6.7.1. Мультимодальная ТФЭ и ТФЭ со смешанными фазами	827
16.6.7.2. Адсорбенты с ограниченно доступной поверхностью (ОДП)	828

16.6.7.3. Молекулярно-импринтированные полимеры (МИП)	829
16.6.7.4. Иммуоффинная экстракция малых молекул	830
16.6.7.5. QuEChERS и дисперсионная ТФЭ	831
16.6.7.6. Специализированные ТФЭ-картриджи для различных классов соединений	832
16.7. Мембранные технологии в пробоподготовке	832
16.8. Методы пробоподготовки твердых образцов	833
16.8.1. Традиционные методы экстракции	834
16.8.2. Современные методы экстракции из твердых веществ	836
16.8.2.1. Экстракция в современном аппарате Сокслета	836
16.8.2.2. Сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ)	836
16.8.2.3. Жидкостная экстракция под давлением (ЖЭД) / ускоренная экстракция растворителем (УСЭР)	837
16.8.2.4. Экстракция с микроволновым нагреванием (МЭ)	838
16.9. Переключение колонок	838
16.10. Пробоподготовка в биохроматографии	839
16.11. Пробоподготовка в ЖХ-МС	842
16.12. Дериватизация в ВЭЖХ	844
Литература	846
<b>Глава 17. Неисправности и способы их устранения</b>	850
17.1. Введение	852
17.2. Профилактика проблем	853
17.2.1. Тесты на пригодность (работоспособность) системы	853
17.2.1.1. Установочная квалификация (УК), операционная квалификация (ОК) и эксплуатационная квалификация (ЭК)	854
17.2.1.2. Тест на эффективность (рабочие характеристики) градиента	854
17.2.1.3. Дополнительное тестирование системы	854
17.2.2. Профилактическое обслуживание	854
17.2.3. Тестирование пригодности системы	855
17.2.4. Хронологические записи	855
17.2.5. Полезные советы и методы	856
17.2.5.1. Удаление воздуха из насоса	856
17.2.5.2. Проверка гидравлического затвора растворителей	857
17.2.5.3. Предварительное смешивание для повышения воспроизводимости удерживания в плавных градиентах	857
17.2.5.4. Очистка и обслуживание обратных клапанов	858
17.2.5.5. Обнаружение утечек	858
17.2.5.6. Устранение негерметичности соединений	859
17.2.5.7. Мытье химической посуды	859
17.2.5.8. Улучшение разделения с помощью трифторуксусной кислоты	859
17.2.5.9. Получение высокоочищенной воды	860
17.2.5.10. Устранение остаточных примесей	860
17.3. Стратегии выявления проблем	862
17.3.1. Найти и исправить	862
17.3.2. Упрощать вместо усложнения	863
17.3.3. Менять за один раз один параметр	863
17.3.4. Устранение воспроизводимых сложностей	863

17.3.5. Замена частей . . . . .	863
17.3.6. Вернуть на место . . . . .	864
17.4. Общие симптомы ВЭЖХ-проблем . . . . .	864
17.4.1. Утечки . . . . .	865
17.4.1.1. Утечки на линии до насоса . . . . .	865
17.4.1.2. Утечки в насосе . . . . .	866
17.4.1.3. Утечки на стороне высокого давления . . . . .	868
17.4.1.4. Утечки в автосамплере . . . . .	868
17.4.1.5. Утечки в колонке . . . . .	871
17.4.1.6. Утечки в детекторе . . . . .	872
17.4.2. Аномальное давление . . . . .	873
17.4.2.1. Слишком высокое давление . . . . .	874
17.4.2.2. Слишком низкое давление . . . . .	875
17.4.2.3. Нестабильность давления . . . . .	877
17.4.3. Нестабильность времени удерживания . . . . .	877
17.4.3.1. Проблемы, связанные со скоростью потока . . . . .	878
17.4.3.2. Проблемы, связанные с размером колонки . . . . .	878
17.4.3.3. Проблемы, связанные с подвижной фазой . . . . .	878
17.4.3.4. Проблемы, связанные с неподвижной фазой . . . . .	879
17.4.3.5. Проблемы, связанные с изменениями температуры . . . . .	879
17.4.3.6. Симптомы проблем, связанных с удерживанием . . . . .	880
17.4.4. Площадь пика . . . . .	882
17.4.4.1. Слишком большая площадь пика . . . . .	882
17.4.4.2. Слишком маленькая площадь пика . . . . .	884
17.4.4.3. Изменяющаяся величина площади пика . . . . .	884
17.4.5. Другие проблемы, связанные с хроматограммой . . . . .	885
17.4.5.1. Проблемы, вызывающие дрейф базовой линии . . . . .	885
17.4.5.2. Проблемы шумов базовой линии . . . . .	888
17.4.5.3. Проблемы, связанные с формой пика . . . . .	891
17.4.6. Интерпретация тестов на пригодность (работоспособность) системы . . . . .	901
17.4.6.1. Интерпретация градиентного тестирования . . . . .	901
17.4.6.2. Интерпретация дополнительных тестов системы . . . . .	908
17.5. Таблицы по устранению неисправностей . . . . .	909
Литература . . . . .	920
<b>Приложение I. Свойства растворителей, используемых в ВЭЖХ . . . . .</b>	<b>922</b>
I.1. Совместимость растворителя с детектором . . . . .	922
I.1.1. Детектирование по поглощению в ультрафиолете . . . . .	922
I.1.2. Детектирование по показателю преломления . . . . .	925
I.1.3. Детектирование масс-спектрометром . . . . .	925
I.2. Полярность и селективность растворителей . . . . .	925
I.3. Безопасность при работе с растворителями . . . . .	928
Литература . . . . .	929
<b>Приложение II. Приготовление буферных подвижных фаз . . . . .</b>	<b>930</b>
II.1. Последовательность операций . . . . .	930
II.2. Методики приготовления некоторых широко используемых буферов . . . . .	931
Литература . . . . .	932
Предметный указатель . . . . .	932