

УДК 543.544.941

## СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕРТВОГО ВРЕМЕНИ В СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

©2018 г. <sup>1,2</sup>**М. О. Костенко\***, <sup>1</sup>**О. И. Покровский**, <sup>1,2</sup>**О. О. Паренаго**,  
<sup>1,2</sup>**В. В. Лунин**

<sup>1</sup> Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

\*kostenko@supercritical.ru

Поступила в редакцию 05.07.2018 г.

В работе опробованы три наиболее распространенных метода измерения мертвого времени применительно к сверхкритической флюидной хроматографии. Продемонстрировано, что при малых концентрациях полярного сорасторовителя в подвижной фазе применение наиболее простого в использовании метода «системного пика» может давать сильно искаженные результаты. При увеличении же доли сорасторовителя до 10–15 % этот метод может применяться для приблизительного определения мертвого времени, в особенности на неполярных стационарных фазах. Использование оксида азота(I) в качестве «неудерживаемого» маркера мертвого времени, напротив, хорошо подходит к случаю, когда подвижная фаза представлена чистым диоксидом углерода. Построенный на других принципах статический метод теоретически может давать весьма точные значения мертвого времени, однако для этого необходимо знать профиль изменения скорости подвижной фазы по тракту хроматографа.

**Ключевые слова:** мертвое время, сверхкритическая флюидная хроматография, системный пик, неудерживаемое соединение, статический способ.

### ВВЕДЕНИЕ

Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) широко применяется для анализа и препаративного разделения веществ различной природы, в особенности фармацевтических хиальных субстанций. Этот метод выгодно отличается от высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) более высокой скоростью, более низкой стоимостью основного компонента подвижной фазы (ПФ), а также большим разнообразием возможных неподвижных фаз (НПФ) при одном и том же составе ПФ [1]. В то же время из-за высокой изотермической сжимаемости сверхкритических (СК) флюидов физико-химическое описание процессов, происходящих в СФХ, становится более сложным по сравнению с ВЭЖХ [2]. Эта сложность оказывается не только при дизайне препартивных методик разделения в СФХ [3], но и при применении этого хроматографического метода для измерения термодинамических параметров, например фазовых равновесий [4–6], коэффициентов диффузии [5, 7] или растворимости веществ в сверхкритических флюидах [8, 9].

Первая проблема, возникающая при использовании СФХ для измерения каких-либо термодинамических величин, заключается в способе нахождения мертвого

времени. Этот параметр участвует в вычислении коэффициента (или фактора) удерживания вещества в хроматографической системе:

$$k = (t - t_0)/t_0, \quad (1)$$

где  $k$  — коэффициент удерживания;  $t$  — время удерживания вещества;  $t_0$  — время выхода неудерживаемого компонента, или мертвое время.

При стандартном предположении о близости хроматографического процесса к равновесному, коэффициент удерживания связан с характеристиками равновесия процесса сорбции вещества на сорбент из подвижной фазы следующими соотношениями:

$$k = \varphi \cdot K = \varphi \cdot \exp[-\Delta G/RT], \quad (2)$$

где  $\varphi$  — фазовое соотношение (отношение объема подвижной фазы к объему неподвижной);  $K$  — константа равновесия сорбции анализа на сорбенте;  $\Delta G$  — свободная энергия Гиббса сорбции анализа на сорбенте;  $R$  — универсальная газовая постоянная,  $T$  — абсолютная температура.

Соотношения (1) и (2) являются основным способом перехода от непосредственно измеряемых в хроматографическом опыте величин к термодинамическим характеристикам адсорбции. Таким образом, точное измерение мертвого времени — необходимое условия для использования хроматографии в физико-химических исследованиях.

Несмотря на общую схожесть современной колоночной СФХ с ВЭЖХ, различия в природе подвижной фазы оказываются критичными по отношению к применимости разработанных для ВЭЖХ методик в СФХ. В частности, это относится и к способам измерения мертвого времени. Единого, общепринятого способа измерения этого параметра не существует [10]. Наибольшее распространение имеют следующие подходы:

1) метод так называемого «системного пика» — заключается в нахождении времени возникновения первого искажения на базовой линии хроматограммы, которое и принимается за мертвое; принято считать, что такой пик является последствием выхода с колонки растворителя пробы [11];

2) метод «неудерживаемого» соединения — заключается во вводе в систему анализа, который в выбранных условиях предположительно должен элюироваться без удерживания сорбентом, с последующим измерением времени его выхода; в СФХ наибольшую популярность в качестве такого вещества приобрел оксид азота(I) [12];

3) статический метод — заключается в измерении объема колонки при помощи поочередного заполнения ее различными растворителями и взвешивания; при известной плотности растворителей и массе заполненной колонки можно рассчитать внутренний свободный объем, который далее можно пересчитать в мертвое время, если знать точный профиль скорости потока подвижной фазы по системе; насколько нам известно, данный метод практически не применяется в СФХ, но распространен в ВЭЖХ [10,13];

4) инкрементный метод — заключается в регистрации времен удерживания серии родственных веществ (членов гомологического ряда алканов, нескольких инертных газов и т.д.) с последующим построением зависимости времени их элюирования от выбранного характеристического параметра, аппроксимацией этой зависимости какой-либо функцией и вычислением  $t_0$  с использованием этой функции [14]; в качестве характеристического параметра используются самые различные величины — от молекулярной массы до параметров потенциалов меж-

молекулярных взаимодействий [14,15]; метод считается наиболее надежным при определении  $t_0$ , однако его применение требует наличия специфического масс-спектрометрического либо пламенно-ионизационного детектора, а также он многократно более сложен и трудоемок в осуществлении. В настоящей работе этот метод не исследовался.

Цель настоящей работы — сравнение различных способов измерения мертвого времени в СФХ и качественное определение областей их применимости.

## **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **Оборудование и реагенты**

Хроматографические опыты проводили на аналитическом сверхкритическом флюидном хроматографе Acuity UPC<sup>2</sup> производства компании Waters (США). Управление прибором и обработка полученных данных осуществлялись при помощи программного обеспечения Empower 3 (Waters, США).

В экспериментах использовали набивные хроматографические колонки с сорбентами различной природы:

1. Torus DIOL — силикагель с привитыми диольными группами (1,8 мкм, 3×100 мм, Waters, США);
2. Torus DEA — силикагель с привитыми диэтиламинными группами (1,8 мкм, 3×100 мм, Waters, США);
3. Torus 1-AA — силикагель с привитыми 1-аминоантраценовыми группами (1,8 мкм, 3×100 мм, Waters, США);
4. Torus 2-PIC — силикагель с привитыми 2-пиколиламинными группами (1,8 мкм, 3×100 мм, Waters, США);
5. ВЕН — гибридный органо-неорганический сорбент на базе силикагеля с мостиковыми этиленовыми группами в структуре (1,8 мкм, 3×100 мм, Waters, США);
6. ВЕН-2ЕР — гибридный органо-неорганический сорбент на базе силикагеля с мостиковыми этиленовыми группами в структуре с привитыми 2-этилпиридиновыми группами (1,8 мкм, 3×100 мм, Waters, США);
7. HSS C18 — силикагель с привитыми октадецильными группами (1,7 мкм, 3×100 мм, Waters, США);
8. Hypercarb — пористый графитированный углерод (5 мкм, 4,6×150 мм, Thermo Fisher Scientific, США) %;
9. Lux Cellulose-2 — силикагель с нанесенным трис-(3-хлоро-4-метилфенилкарбаматом) целлюлозы (5 мкм, 4,6×150 мм, Phenomenex, США);
10. Kinetex C18 — частично-пористый силикагель с привитыми октадецильными группами (2,6 мкм, 4,6×150 мм, Phenomenex, США).

В качестве основного компонента подвижной фазы использовали CO<sub>2</sub> пищевой чистоты 99,5 % (ГОСТ 8050-85, ОАО Линде Газ Рус, Балашиха, Россия). Метanol и ацетонитрил марки ОСЧ (Химмед, Москва, Россия), а также изопропанол и *n*-гексан марки ОСЧ (Компонент-Реактив, Москва, Россия) применяли как растворители для подвижной фазы и растворители проб. Оксид азота(I) пищевой чистоты использовали в качестве маркера мертвого времени.

### **Измерение мертвого времени**

Условия проведения опытов были следующими: выходное давление 16 МПа температура терmostата колонок 35 °C, скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин

(при температуре 13 °С, которая создается на аккумулирующей голове насоса СО<sub>2</sub>, и давлении, необходимом для подачи растворителя в систему с заданной скоростью), если не указано иное. Все опыты воспроизводились не менее трех раз. Ошибку эксперимента оценивали как стандартное отклонение получаемых величин от среднего значения.

**Метод «системного пика».** В систему вводили образцы веществ, часто применяемых в качестве растворителя пробы: метanol, изопропанол или ацетонитрил объемом 1 мкл. Отклик детектора регистрировали на длине волны 210 нм. В качестве мертвого времени использовали время возникновения первого искажения базовой линии хроматограммы.

**Метод «неудерживаемого» соединения.** В данной работе в качестве маркера мертвого времени применяли N<sub>2</sub>O. Так как при нормальных условиях это вещество существует в газообразном состоянии, для ввода в систему его было необходимо растворить в каком-либо жидком растворителе, в качестве которого использовали метanol. Его охлаждали в морозильной камере до -30 °С, затем барботировали N<sub>2</sub>O из баллона через слой метанола в течение 5 мин. Полученный раствор переносили в хроматографическую виалу, которую помещали в терmostатируемый автосampler хроматографа при температуре 15 °С. Объем вводимой пробы раствора составлял 2 мкл. Детектирование вели на длине волны 195 нм. В предложенных условиях использование раствора N<sub>2</sub>O возможно в течение 2–3 ч после прокола септы виалы, после чего значительная его часть улетучивается и концентрация становится слишком малой для уверенного детектирования пика.

**Статический метод.** Ряд колонок поочередно заполняли метанолом и хлороформом (в случае колонки Lux Cellulose-2 вместо хлороформа использовали *n*-гексан во избежание вымывания с сорбента адсорбированного хирального компонента) в течение 15–20 мин при потоке 1 мл/мин, после каждого заполнения массу колонки измеряли на аналитических весах. Используя справочные значения плотности, рассчитывали мертвый объем колонок.

Затем измеряли внутренний мертвый объем системы между инжектором и ячейкой детектора. Для этого вместо колонки в хроматограф устанавливали соединитель капилляров с нулевым мертвым объемом. Далее по системе пускали поток чистого метанола с постоянной скоростью 1 мл/мин, вводили в систему пробу 1 мкл хлороформа, регистрировали время его выхода и по нему рассчитывали общий объем системы без колонки.

Необходимая информация о плотности СК СО<sub>2</sub> при известном давлении и температуре была взята из справочных данных NIST [16].

Непосредственно из показаний прибора можно определить только температуру и объемную скорость потока подвижной фазы после насоса ( $T_1$  и  $u_1$ ). Для расчета остальных скоростей были введены следующие допущения:

1) на участках капилляров до и после колонки температуры постоянны и равны  $T_1$  и  $T_2$ , а перепады давлений малы по сравнению с таковым на самой колонке; в данном приближении скорости потока на этих участках  $u_1$  и  $u_2$  тоже постоянны; в пользу допустимости такого приближения свидетельствует тот факт, что в опытах без колонки общий перепад давления по системе составлял не более 0,1 МПа;

2) непосредственно перед колонкой температура изменяется скачком от  $T_1$  до  $T_C$  (температура внутри колонки) и сохраняется постоянной вдоль всей колонки; такое допущение вполне правомерно, так как конструкционно нагреватель потока подвижной фазы располагается прямо перед колонкой, а температура самой

## **Сравнение способов определения мертвого времени в сверхкритической флюидной хроматографии**

колонки поддерживается постоянной в воздушном термостате; температура после колонки ( $T_2$ ) быстро изменяется до комнатной;

3) давление линейно изменяется вдоль колонки, среднее значение перепада давления можно рассчитать как среднее арифметическое от значений давления на ее концах; применимость такого допущения в СФХ ранее демонстрировалась в литературе [17].

С учетом вышесказанного, значение мертвого времени определялось по формуле (3):

$$t_0 = \frac{V_1}{u_1} + \frac{V_C}{u_1 \cdot \frac{\rho_1}{\rho_C}} + \frac{V_2}{u_1 \cdot \frac{\rho_1}{\rho_2}} + \frac{V_1}{u_1} + \frac{V_C}{u_C} + \frac{V_2}{u_2}, \quad (3)$$

где  $V_1$ ,  $V_C$ ,  $V_2$  — мертвые объемы системы от инжектора до колонки, внутри колонки и от колонки до детектора, соответственно;  $\rho$ ,  $\rho_C$ ,  $\rho$  — плотности подвижной фазы на участках от инжектора до колонки, внутри колонки (усредненная величина) и от колонки до детектора, соответственно;  $u_1$ ,  $u_C$ ,  $u_2$  — объемные скорости потока подвижной фазы на участках от инжектора до колонки, внутри колонки (усредненная величина) и от колонки до детектора, соответственно.

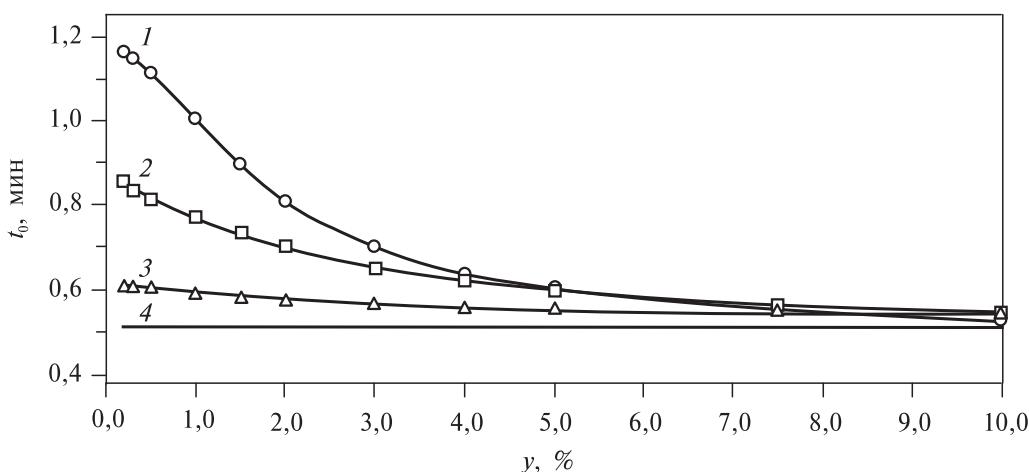
## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Метод «системного пика».** В табл. 1 представлены результаты определения мертвых времен ряда колонок способом регистрации первого искажения базовой линии при содержании сорасторовителя в подвижной фазе 0,5 % (сорасторовитель и растворитель пробы выбирали одинаковыми). Из геометрических размеров колонки был рассчитан максимальный внутренний объем колонок без сорбента, равный 0,707 мл. С учетом внеколоночного объема системы, равного 0,018 мл, полный внутренний объем составляет 0,725 мл. При начальной скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин мертвое время принципиально не может превышать 0,725 мин (по причине увеличения температуры и падения давления вдоль тракта хроматографа плотность элюента может быть только ниже начального значения, что ведет к увеличению объемной скорости и, соответственно, уменьшению мертвого времени). Как следует из табл. 1, в целом ряде случаев мертвое время, определенное по первому искажению базовой линии, превышает предельное (0,725 мин). Иными

*Таблица 1*

**Мертвые времена для ряда колонок, измеренные методом «системного пика»  
при введении различных растворителей**

Неподвижная фаза	Время $t_0$ , мин		
	метанол	изопропанол	ацетонитрил
Torus 1-AA	0,862 ± 0,008	0,670 ± 0,001	0,538 ± 0,001
Torus DEA	1,112 ± 0,002	0,816 ± 0,001	0,605 ± 0,002
Torus 2-PIC	1,010 ± 0,002	0,700 ± 0,003	0,538 ± 0,001
ВЕН	0,921 ± 0,002	0,902 ± 0,004	0,87 ± 0,005
ВЕН-2ЕР	0,823 ± 0,003	0,719 ± 0,002	0,600 ± 0,001



**Рис. 1.** Зависимость времени первого искажения базовой линии от объемной доли сопротивителя в ПФ:

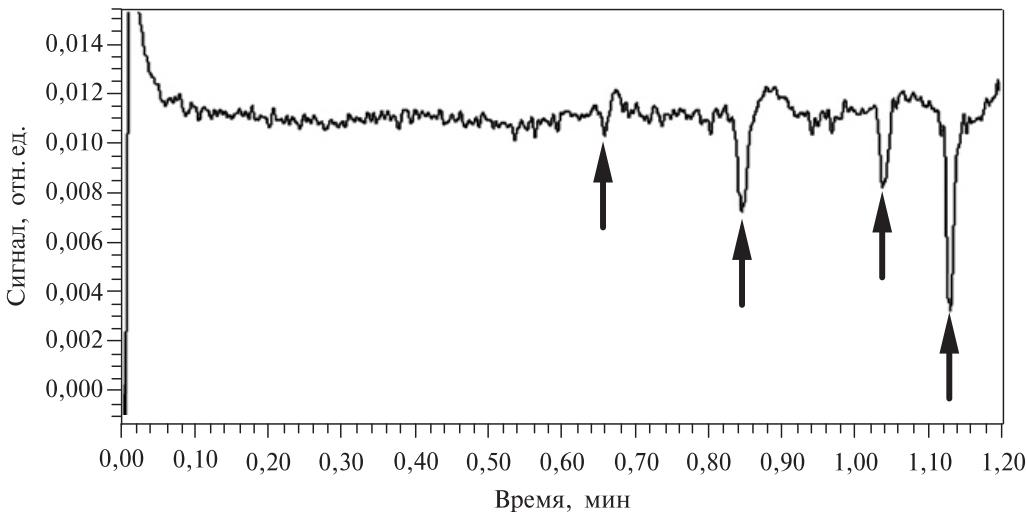
1 — метанол, 2 — ацетонитрил, 3 — изопропанол; для сравнения приведено мертвое время, определенное как время выхода  $N_2O$  в отсутствие сопротивителя (линия 4) для колонки Togus DEA

словами, данный метод дает результаты, противоречащие физическому смыслу определяемой величины. Кроме того, значения мертвых времен для одной колонки, полученные при использовании различных растворителей, сильно различаются. На полярных стационарных фазах удерживание, как правило, убывает в ряду метанол > изопропанол > ацетонитрил.

Значения  $t_0$ , получаемые данным методом, снижаются с увеличением объемной доли сопротивителя ( $y$ ) и при  $y = 10 - 15$  об. % выходят на плато (рис. 1). При этом они становятся весьма близкими к значениям, получаемым вводом  $N_2O$  (см. ниже). В рассмотренных случаях при использовании ацетонитрила выход криевых на плато наблюдается при более низких значениях  $y$ , чем для метанола и изопропанола.

Можно выдвинуть предположение о возможности приблизительно оценивать мертвое время хроматографической системы данным способом, но только при содержании сопротивителя в подвижной фазе не менее 10 об. %.

При использовании этого метода возникает ряд сложностей, связанных с техническими особенностями СФХ. Во-первых, в отличие от ВЭЖХ, где пробу обычно вводят в растворителе, идентичном по составу к используемой подвижной фазе, в классическом варианте СФХ этого сделать невозможно, так как подвижная фаза представляет собой флюид под высоким давлением, которое невозможно создать в стандартной стеклянной виале с образцом. Это часто приводит к увеличению времени удерживания растворителя пробы. Как было показано ранее, при низких долях сопротивителя в подвижной фазе значения мертвых времен сильно завышены. Во-вторых, часто при использовании такого способа наблюдаются осложнения, связанные с тем, что на хроматограмме вместо одного пика возникает целый ряд сигналов (рис. 2), положение и даже количество которых могут существенно изменяться при варьировании доли сопротивителя в подвижной фазе. В этом случае среди всех регистрируемых искажений мы выбирали первый «стабильный» по форме пик, время выхода которого постепенно уменьшается с увеличением содержания сопротивителя. Однако такой подход может

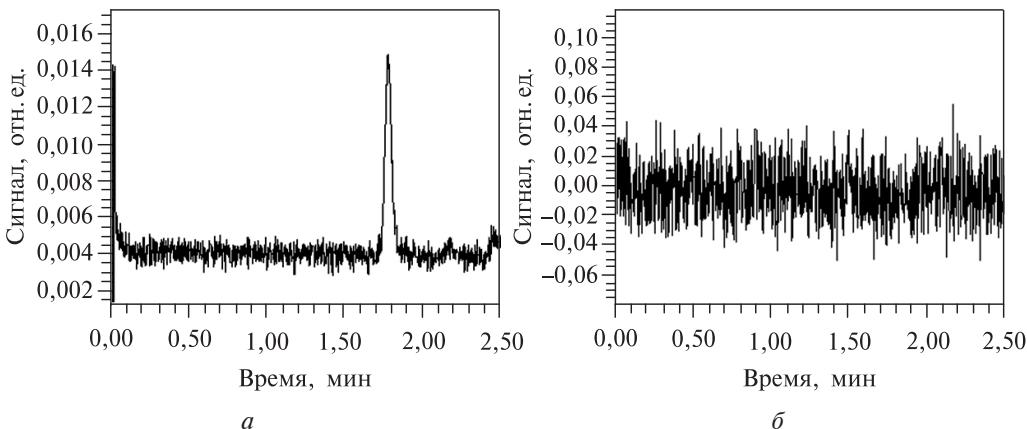


**Рис. 2.** Искажения на базовой линии при введении 1 мкл метанола; колонка Torus DEA, подвижная фаза содержит 0,5 % метанола

приводить к существенным ошибкам в определении мертвого времени, и его использование при проведении сколько-нибудь точных физико-химических измерений нежелательно.

**Использование N<sub>2</sub>O как маркера мертвого времени.** Первые же опыты с N<sub>2</sub>O показали, что у этого способа есть существенный недостаток, связанный со сложностью спектрофотометрического детектирования. Детектирование N<sub>2</sub>O возможно только в диапазоне длин волн 190—195 нм, где хорошо поглощают практически все сорасторовители, применяющиеся в СФХ. Это не позволяет применять данный способ при использовании сорасторовителя, так как пик N<sub>2</sub>O сливается с шумом (рис. 3).

При спектрофотометрическом детектировании этот способ можно применять только в отсутствие сорасторовителя.



**Рис. 3.** Хроматограммы раствора N<sub>2</sub>O в метаноле, колонка Lux Cellulose-2:  
а — элюирование чистым CO<sub>2</sub>; б — в подвижной фазе содержится 1% метанола

В табл. 2 показаны значения мертвых времен, определенных по первому и второму способу. Время удерживания  $N_2O$  на большинстве испытанных стационарных фаз значительно меньше времени выхода жидких растворителей. На полярных стационарных фазах различия в значениях, определенных двумя методами, составляют более 4 %, в то время как на неполярной HSS C18 — менее 1 %.

**Статический метод.** Результаты, полученные статическим методом, представлены в табл. 3. Для сравнения приведены также результаты, полученные при использовании  $N_2O$ . В этой же таблице приведены рассчитанные значения превышения скорости потока подвижной фазы на колонке по отношению к начальной скорости ( $\Delta u$ ). Эти величины оказались весьма существенными; пренебрежение изменением скорости потока по тракту хроматографа может привести к значительно завышенным значениям мертвого времени.

Значения мертвого времени, полученные статическим методом, во всех случаях меньше полученных по выходу  $N_2O$ . Это может быть обусловлено как удержива-

*Таблица 2*

**Сравнение значений мертвого времени, полученных методом «системного пика»  
и методом неудерживаемого компонента ( $N_2O$ )  
(12 МПа, 40 °C, объемная скорость потока элюента при 13 °C 1 мл/мин)**

Неподвижная фаза	Время $t_0$ , мин		$\Delta t_0$ , %
	элюент: $CO_2$ /ацетонитрил = 9/1; метод «системного пика»	элюент: $CO_2$ ; метод неудерживаемого компонента	
Torus 2-PIC	$0,517 \pm 0,001$	$0,485 \pm 0,001$	6,3
Torus DEA	$0,547 \pm 0,002$	$0,513 \pm 0,002$	6,1
Torus 1-AA	$0,506 \pm 0,002$	$0,473 \pm 0,002$	6,5
Torus DIOL	$0,510 \pm 0,001$	$0,480 \pm 0,001$	6,0
HSS C18	$0,508 \pm 0,002$	$0,504 \pm 0,001$	0,9
BEH	$0,580 \pm 0,001$	$0,548 \pm 0,002$	5,6
BEH 2-EP	$0,559 \pm 0,001$	$0,533 \pm 0,001$	4,7

*Таблица 3*

**Сравнение мертвых времен, полученных статическим способом и вводом  $N_2O$   
для ряда неподвижных фаз**

Стационарная фаза	$V_C$ , мл	$\Delta u$ , %*	$t_{0\text{ стат}}$ , мин*	$t_{0N_2O}$ , мин	$\Delta t_0$ , %
Torus 1-AA	0,46	13,9	0,51	$0,533 \pm 0,001$	4,3
HSS C18	0,48	13,8	0,53	$0,558 \pm 0,001$	5,0
Hypercarb	1,89	14,0	1,90	$1,906 \pm 0,006$	0,3
Kinetex C18	1,35	141	1,37	$1,375 \pm 0,002$	0,4
Lux Cellulose-2	1,71	14,1	1,72	$1,771 \pm 0,001$	5,1

\* Погрешности значений не указаны ввиду неопределенности ошибки, обусловленной принятыми допущениями.

нием маркера на стационарной фазе, так и систематическими погрешностями статического метода, в котором получение величины мертвого времени связано с необходимостью использовать различные приближения для пересчета мертвого объема в мертвое время. Точность получаемых результатов будет определяться уровнем этих приближений. Статический метод позволяет с достаточно высокой точностью оценить объем пустот внутри колонки при нормальных условиях, а давление в условиях СФХ значительно выше атмосферного. Кроме того, в среде СК флюида отсутствует поверхностное натяжение. Как было показано в работе [18], изменение давления и растворителя может серьезно сказываться на измеряемой величине мертвого объема колонки и вносить дополнительную погрешность в измерения.

С точки зрения исполнения, статический способ наиболее трудоемкий и времязатратный, но теоретически он способен давать наиболее точные результаты.

## ВЫВОДЫ

1. Использование первого искажения базовой линии для определения «мертвого времени» в методе СФХ возможно только при значительном содержании сорасторовителей в подвижной фазе (более 10 об. %). Такой способ удобен для быстрой оценки мертвого времени и при соблюдении указанного условия дает приемлемую точность, особенно на неполярных стационарных фазах.

2. Ввод  $N_2O$  в систему дает хорошую оценку мертвого времени, однако такой способ неприменим при использовании сорасторовителей из-за проблем с детектированием.

3. Статический способ дает наименьшие и, предположительно, наиболее точные значения мертвого времени, однако он наиболее сложен в исполнении, а его точность может существенно зависеть от допущений, используемых при пересчете внутреннего объема системы и колонки в мертвое время.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено в рамках государственного задания № 0088-2014-0003 ИОНХ РАН (тема № 45.3) в области фундаментальных научных исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lesellier E., West C. J. Chromatogr. A. 2015. Vol. 1382. P. 2.*
2. *Guiochon G., Tarafder A. J. Chromatogr. A. 2011. Vol. 1218. P. 1037.*
3. *Rajendran A. J. Chromatogr. A. 2012. Vol. 1250. P. 227.*
4. *Chester T.L. J. Chromatogr. A. 2004. Vol. 1037. P. 393.*
5. *Chester T.L. Physicochemical property measurements using SFC instrumentation / In C. Poole (Ed). Supercritical fluid chromatography. Elsevier, 2017. 572 p.*
6. *Page S.H., Sumpter S.R., Lee M.L. J. Microcol. Sep. 1992. Vol. 4. P. 91.*
7. *Roth M. J. Microcol. Sep. 1991. Vol. 3. P. 173.*
8. *Roth M. J. Chromatogr. A. 2004. Vol. 1037. P. 369.*
9. *Bartle K.D., Clifford A.A., Jafar S.A., Kithinji J.P., Shilstone G.F. J. Chromatogr. 1990. Vol. 517. P. 459.*
10. *Rimmer C.A., Simmons C.R., Dorsey J.G. J. Chromatogr. A. 2002. Vol. 965. P. 219.*
11. <http://www.chromatographyonline.com/column-dead-time-diagnostic-tool>
12. *Vajda P., Guiochon. J. Chromatogr. A. 2013. Vol. 1309. P. 96.*
13. *Gritti F., Kzakevich Y., Guiochon G. J. Chromatogr. A. 2007. Vol. 1161. P. 157.*

14. Parcher J.F., Selim M.I. Anal. Chem. 1979. Vol. 51. P. 2154.
  15. Nakahara T., Chappellear P.S., Kobayashi R. Ind. Eng Chem. Fundam. 1977. Vol. 16. P. 220.
  16. Lemmon E.W., McLinden M.O., Friend D.G. / Thermophysical Properties of Fluid Systems NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. Ed. P.J. Linstrom, W.G. Mallard. Gaithersburg MD, USA: National Institute of Standards and Technology.
  17. Janssen H.-G., Snijders H.M.J., Rijks J.A., Cramers C.A. J. High Res. Chromatogr. 1991. Vol. 14. P. 438.
  18. Gritti F., Martin M., Guiochon G. J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1070. P. 13.
- 

## **COMPARISON OF HOLD-UP TIME DETERMINATION METHODS IN SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY**

**<sup>1,2</sup>*M. O. Kostenko, <sup>1</sup>O. I. Pokrovskiy, <sup>1,2</sup>O. O. Parenago, <sup>1,2</sup>V. V. Lunin***

<sup>1</sup> *Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia*

<sup>2</sup> *Lomonosov Moscow State University, Chemical Department, Moscow, Russia*

Three most common methods for measuring chromatographic hold-up time in supercritical fluid chromatography are tested. It is shown that at low concentrations of polar cosolvents in the mobile phase, the use of the simplest «system peak» method leads to highly inaccurate results. With an increase in the percentage of co-solvent to 10–15 %, this method can be used for rough estimation of hold-up time values, especially for non-polar stationary phases. The use of nitric oxide(I) as a «non-retentive» hold-up time marker, on the contrary, is well suited only in the case of pure carbon dioxide as a mobile phase. The static method theoretically can give very precise values of hold-up time, but it requires the knowledge of mobile phase velocity profile along the whole chromatograph tract.

**Keywords:** hold-up time, supercritical fluid chromatography, system peak, non-retentive compound, static method.

---