

ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ

М. П. ПЕРЕЛЬРОЙЗЕН,
Г. И. БАРАМ, В. Ф. ПЕРШИН

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ И ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ «МИЛИХРОМ® А-02»

Високоєфективна рідинна хроматографія останнім часом перетворилася практично на універсальний інструментальний метод аналітичної хімії, що дає підставу до перегляду принципів організації багатоцільових аналітичних лабораторій як в органах державного контролю, так й у промисловості, медицині, криміналістиці, наукових установах тощо.

Сутність реорганізації полягає у заміні на ВЕРХ (де це можливо та економічно доцільно) великої кількості використовуваних фізико-хімічних методів аналізу.

Найбільш доцільним, на наш погляд, є застосування для цієї мети компактного мікроколонкового високоєфективного рідинного хроматографа «МилиХром® А-02» (АО «ЭкоНова», Новосибірськ, Росія), який за технічними характеристиками відповідає кращим світовим аналогам.

High performance liquid chromatography has become practically an universal instrumental method of analytical chemistry of the last time, which gives the reason to review the organization principles of analytical laboratories as well as in the bodies of state control and in industry, medicine, forensic science, scientific institutions, etc.

The sense of reorganization consists in replacement for High performance Liquid Chromatography Practice (where it is possible and has the economical expediency) on bigger number of practical physico-chemical methods of analysis.

On our opinion, the most advisable at the time would be the usage of liquid chromatograph of high performance «MilliChrom® А-02».

Интенсивное развитие высокоэффективной жидкостной колоночной хроматографии (ВЭЖХ) в течение последних 20 лет привело к тому, что в настоящее время названный метод стал практически универсальным инст-

рументальным методом аналитической химии. Это обстоятельство дает основание для пересмотра принципов организации многоцелевых аналитических лабораторий как в органах государственного контроля, так и в промышленности, медицине, криминалистике, научных учреждениях и т. д. Суть реорганизации заключается в замене на ВЭЖХ (где это возможно и экономически целесообразно) большого числа практикуемых физико-химических методов анализа.

Многоцелевые аналитические лаборатории, использующие в своей практике в большинстве случаев один универсальный метод, ориентированный на применение однотипного основного и вспомогательного оборудования, имеют следующие очевидные преимущества организационного и экономического характера:

- упрощение проблем ремонта, замены, комплектования испытательного оборудования и поверки средств измерений;
- возможность быстрой перестройки хроматографа с одного типа анализа на другой;
- значительное повышение оперативности при одновременном выполнении как массовых, так и единичных анализов;
- сокращение ассортимента вспомогательных химических реактивов;
- упрощение процесса подготовки квалифицированных кадров и снижение численности занятых химиков-аналитиков (за счет автоматизации проведения анализов);
- значительное упрощение процедуры аттестации методик анализа и времени, необходимого для их освоения;
- возможность организации сети типовых аналитических лабораторий и создания единой системы аналитического контроля на предприятиях любого ведомства (Госстандарта, Санэпиднадзора, МВД, МЧС, Таможенного комитета, Минздрава, Минприроды и др.).

Наиболее широкое применение ВЭЖХ находит в следующих областях химического анализа:

- 1) при контроле качества продуктов питания (тонизирующие и вкусовые добавки, альдегиды, кетоны, витамины, сахара, красители, консерванты, гормональные препараты, антибиотики, триазиновые, карбаматные и др. пестициды, микотоксины, нитрозоамины, полициклические ароматические углеводороды и др.);
- 2) при проведении мероприятий по охране окружающей среды (фенолы, органические нитросоединения, главные катионы, моно- и полициклические ароматические углеводороды, ряд пестицидов, главные анионы);
- 3) в криминалистике (наркотики, органические взрывчатые вещества и красители, сильнодействующие фармацевтические препараты);
- 4) в фармацевтической промышленности (стероидные гормоны, практически все препараты – продукты органического синтеза, антибиотики, полимерные препараты);

5) в медицине (биохимические вещества, аминокислоты, пурины и пиримидины, стероидные гормоны, липиды и др.)

6) в сельском хозяйстве (определение нитрата, фосфата и калия в почвах, определение необходимого количества вносимых удобрений, питательной ценности кормов, содержания пестицидов в почве, воде и сельскохозяйственной продукции);

7) в биохимии, биоорганической химии, генной инженерии, биотехнологии (сахара, липиды, стероиды, белки, аминокислоты, нуклеозиды и их производные, витамины, пептиды, олигонуклеотиды, порфирины и др.);

8) в органической химии (практически все устойчивые продукты органического синтеза, красители, термолабильные соединения, нелетучие соединения);

9) в неорганической химии (практически все растворимые соединения в виде ионов и комплексных соединений).

Несмотря на то, что развитию ВЭЖХ в промышленно развитых странах, также как и исследованиям в области компьютерных технологий, космоса и медицины, придается стратегическое значение, ряд причин сдерживают ее практическое внедрение в России, Украине и других странах СНГ.

К ним, прежде всего, относятся следующие факторы:

- достаточно жесткая конкуренция со стороны более известных методов анализа и традиционного оборудования, что сдерживает внедрение ВЭЖХ на стадии разработки «официальных» методик;

- отсутствие притока молодых специалистов, владеющих современными методами анализа с использованием высокопроизводительного аналитического оборудования, в комплект которого входит компьютерная техника;

- медленное внедрение ВЭЖХ в официально утверждаемые (органами Госстандарта, Санэпиднадзора, Минздрава, МВД, Минприроды, другими министерствами и ведомствами) методы контроля.

В АО «ЭкоНова» (г. Новосибирск) в тесном взаимодействии с рядом институтов Сибирского отделения Российской академии наук (Институтом ядерной физики, Лимнологическим институтом, Новосибирским институтом биоорганической химии), при участии германской фирмы «Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Wissenschaftliche Gerätebau», разработан новый компактный высокоэффективный жидкостный хроматограф «Милихром® А-02». (Авторский коллектив: Барам Г. И., Болванов Ю. А., Грачев М. А., Зенков А. П., Каргальцев В. В., Козак В. Р., Купер Э. А., Перельройзен М. П., Пирог В. В., Шойхет Г. Я.).

Этот прибор прошел все необходимые испытания и зарегистрирован в Государственном реестре средств измерений РФ (№ 15117–96, сертификат № 2098) и Государственном реестре средств измерений Украины (№ 15117–96, сертификат № UA-MI/Зр-186–2000).

Милихром®А-02, получил статус полевого хроматографа благодаря принципам микроколоночной ВЭЖХ.

Следует отметить, что при использовании ВЭЖХ прослеживается явная тенденция к переходу на более короткие колонки. Так, если 10–15 лет тому назад наиболее обычными были колонки длиной (L) 250 мм и диаметром ($\varnothing$) 4,6 мм, то в последние годы все чаще применяются колонки размером: $L = (100–150)$ мм и $\varnothing = 2$ мм.

Основным препятствием для интенсивного внедрения ВЭЖХ на коротких колонках малого диаметра является отсутствие пригодных для работы с ними хроматографов. По сравнению со стандартными, такие хроматографы должны обеспечивать малые скорости потока и малое внеколоночное уширение хроматографических зон – при наличии достаточно высоких метрологических характеристик, обеспечивающих качественный химический анализ.

Другой сдерживающий фактор – отсутствие типовых методик анализа с применением микроколоночной ВЭЖХ.

Идея применения микроколонок в жидкостной хроматографии для повышения чувствительности анализа была реализована еще до официального «рождения» ВЭЖХ [1–3]. Позже к ней не один раз возвращались (и возвращаются до сих пор), но, несмотря на очевидные достоинства, широкого распространения такой вариант ВЭЖХ так и не получил.

Подробное рассмотрение причин, по которым этот метод не находит широкого применения в практике, позволяет, как нам кажется, выявить главные причины – несовместимость предлагаемых вариантов миниатюризации ВЭЖХ с существующим масштабом химического анализа и несогласованность их рекордных возможностей с более «приземленными» требованиями, лежащими в основе постановки типовых аналитических задач.

В погоне за рекордами, как часто бывает, исследователи пока не смогли создать оборудование, по своей надежности конкурентоспособное в настоящее время, так что максимальные достижения оказались пока не востребованными. В науке и технике аналогичных примеров множество.

Разрабатывая свой вариант микроколоночной ВЭЖХ, мы старались учесть это обстоятельство и особое внимание уделили выбору масштаба хроматографии, обоснованного с точки зрения практического применения для выполнения химического анализа.

При выборе длины колонки (L) были приняты во внимание результаты фундаментальных исследований по ВЭЖХ, опубликованные в 70-х годах [4–7], из которых следовало, что по многим критериям оптимальной является колонка с $N \approx 5000–6000$ т.т.

Ее разделяющая способность (пиковая емкость Z), в зависимости от приемлемого на практике разрешения соседних пиков $R_{i,i+1} = 1,0–1,5$, составляет 30–50 пиков (см. рис. 1), и этого достаточно для разделения весьма сложных смесей.

Цитируемые авторы показали, что в случае плохо разделяемых веществ выгоднее не увеличивать N колонки за счет ее удлинения, а оптимизировать состав подвижной фазы.

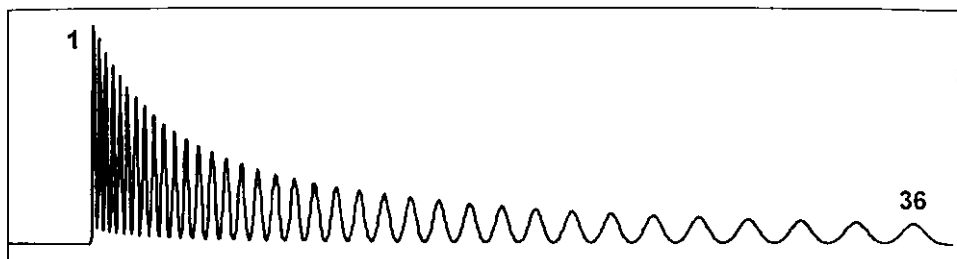


Рис. 1. Компьютерная хроматограмма, иллюстрирующая Z колонки

Параметры: $N = 6000$ т.т.; $k'_1 = 0$; $k'_{36} = 10$; $R_{1,1}, 1 = 1,3$

Исходя из этих соображений, мы ограничили N проектируемой колонки величиной 5000 т.т., ориентируясь при этом на самые мелкодисперсные (доступные на то время) сорбенты с $d_p = 5$ мкм, позволяющие минимизировать ее длину и, тем самым, время разделения. Т.к. в ВЭЖХ для этих сорбентов реально достигалась $H = 12-15$ мкм, то $L = N \cdot H = 60-75$ мм.

Объем колонки ($V_{кол}$) выбирали из необходимости сохранения ее N для малолетучего вещества ($k' = 1$) с учетом размытия хроматографической полосы в ячейке детектора. В качестве детектора использовали двухлучевой УФ-микроспектрофотометр (190–360 нм) с Z-образной ячейкой объемом 1,8 мкл (1,6 мм x 1,2), разработанный и изготовленный в СО АН СССР. Экспериментально найденное значение дисперсии ячейки вместе с входным капилляром ($\sigma_{яч}$) оказалось равным 0,3–0,5 мкл. Принимая, что вклад $\sigma_{яч}$ в дисперсию хроматографического пика ($\sigma_{пик}$) не должен превышать 10% [8] (для пика вещества с $k' = 1$ $\sigma_{пик} \geq 4$ мкл), а объем пор типичного для ВЭЖХ силикагельного сорбента составляет $\approx 0,75 V_{кол}$, для колонки с $N = 5000$ т.т. вычисляли ее минимальный объем $V_{кол}$ из уравнения:

$$V_{кол} = \frac{V_0}{0,75} = \frac{\sigma_{пик} \cdot \sqrt{N}}{0,75 \cdot (1 + k')} \approx 200 \text{ мкл}, \quad (1)$$

где V_0 – свободный объем колонки.

Так как колонки экономически выгоднее делать из стандартных, коммерчески доступных трубок, диаметры которых изменяются дискретно, то для колонки с $V_{кол} = 200$ мкл и $L = 60-75$ мм ближе всего размеры 62 мм x 2 мм, взятые нами в качестве базовых. По сравнению со «стандартной» ВЭЖХ-колонкой, объем нашей был меньше примерно в 20 раз, что и дало основание назвать ее «микроколонкой».

После экспериментальных проверок нескольких вариантов конструкции микроколонки, узла ввода пробы и методик упаковки колонок «жесткими» прямыми и обращенными фазами с $d_p = 5$ мкм удалось достичь проектной эффективности 5000 т.т. Такой результат был получен во многом благодаря неоценимым советам А. Карапетяна.

В современной ВЭЖХ явно видны тенденции к уменьшению либо длины колонки, либо ее диаметра (относительно «стандартной» колонки 250 мм х 4,6 мм). Предложенный нами подход отличается тем, что мы уменьшили их *одновременно*. О том, какие это дает преимущества, говорят «теоретические» хроматограммы на рис. 2.

Из них следует, что при постоянной линейной скорости элюирования переход от «стандартной» колонки к колонке 75 мм х 2 мм сопровождается уменьшением рабочего давления в 3 раза, уменьшением расхода элюента в 18 раз, увеличением чувствительности анализа в 10 раз и его ускорением в 3 раза.

Качество разделения при этом, конечно, ухудшается, но не столь заметно.

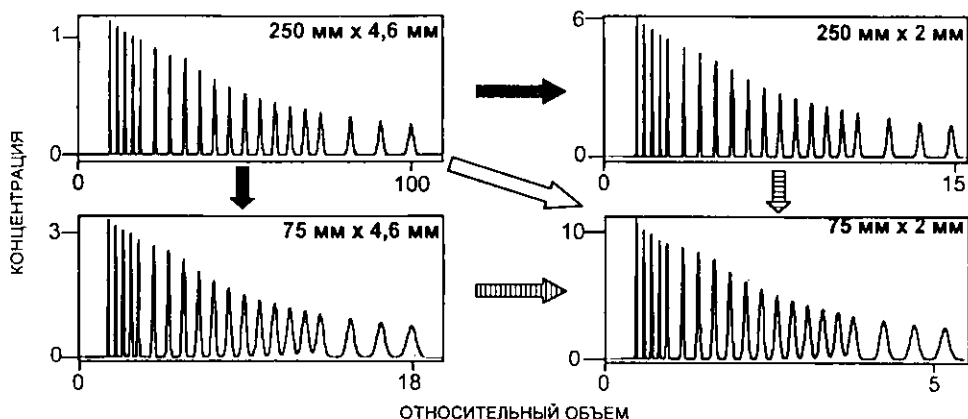


Рис. 2. Компьютерные хроматограммы, иллюстрирующие разделение одной и той же смеси из 20 веществ на различных колонках

Данные хроматографирования на колонках различных размеров приведены в таблице.

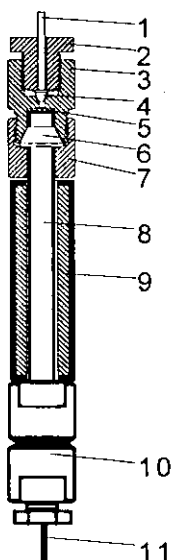
ПАРАМЕТРЫ	Размеры колонок (длина х диаметр), мм			
	250х4,6	250х2,0	75х4,6	75х2,0
Эффективность, число теоретических тарелок	20 000	20 000	6 000	6 000
Относительное входное давление	100	100	30	30
<i>Относительные величины для вещества с фактором удерживания $k' = 10$</i>				
Объем удерживания	100	18,9	30,0	5,7
Время удерживания	100	100	33,3	33,3
Высота пика	1	5	3	10

Примечание.

Высоты пиков выражены относительно пиков на хроматограмме «250 мм х 4,6 мм». Последний пик соответствует веществу с $k' = 10$. Линейная скорость потока для всех разделений одинаковая.

Все колонки хроматографов серии «Милихром» изготавливаются из нержавеющей стали 12Х18Н10Т, герметизируются при помощи конических уплотнений типа Swagelok™ и при этом выдерживают давление до 50 МПа. Сорбент в колонках удерживается фильтрами из пористой нержавеющей стали толщиной 0,1 мм и порами 2–3 мкм.

Колонка хроматографа «Милихром®А-02» (рис. 3) термостатируется при помощи электрического нагревателя (трубка 9 улучшает теплообмен). Для минимизации размывания образца при его введении в колонку во всех хроматографах «Милихром» мы использовали так называемый «капиллярный» способ инъекции. Его суть заключается в том, что раствор образца заданного объема всасывается в капилляр-иглу, которая затем герметично соединяется с колонкой, и образец вводится в нее потоком элюента. Такой метод инъекции с остановкой потока стал возможен благодаря тому, что в хроматографах серии «Милихром» применяются прецизионные насосы шприцевого типа, способные осуществлять не только элюирование, но и дозирование образца с высокой точностью. Заметим, что в «классической» ВЭЖХ остановка потока элюента для ввода образца по многим причинам считается недопустимой, но наши результаты это мнение опровергают.



- 1 – капилляр (сталь, $\varnothing_{\text{внеш}} = 1,6 \text{ мм}$);
- 2 – винт;
- 3 – входное гнездо с приемным конусом;
- 4 – конус для присоединения капилляра;
- 5 – входной фильтр ($\varnothing = 4 \text{ мм}$);
- 6 – конус для присоединения трубки;
- 7 – гайка;
- 8 – трубка ($l = 75 \text{ мм}$; $\varnothing_{\text{внеш}} = 4 \text{ мм}$; $\varnothing_{\text{внут}} = 2 \text{ мм}$);
- 9 – трубка-теплообменник (алюминий);
- 10 – выходная часть колонки в сборе;
- 11 – капилляр (фторопласт, $\varnothing_{\text{внеш}} = 1,6 \text{ мм}$).

Конструкция колонки полностью симметрична

Рис. 3. Колонка хроматографа «Милихром®А-02»

Для герметизации иглы в устройстве ввода в хроматографе «Милихром®А-02» происходит следующим образом – специальное пружинное устройство, приводимое в действие электромотором автодозатора, сжимает уплотняющее кольцо после ввода иглы и снимает с него нагрузку перед выводом иглы. В отличие от прежних колонок, в «Милихроме®А-02» колонка симметрична и соединяется с устройством для ввода проб коротким капилляром. Это несколько увеличивает внеколоночное размывание зоны образца

($\sigma_{\text{доэ}}$), но устраняет необходимость изготавливать каждую колонку со своим устройством ввода проб. Для компенсации возросшей величины $\sigma_{\text{доэ}}$ длина колонки прибора «Милихром®А-02» увеличена до 75 мм.

Оценку влияния $\sigma_{\text{экстра}}$ на эффективность разделения ($N_{\text{хром}}$), наблюдаемую на хроматограмме для колонки с эффективностью $N_{\text{кол}}$, проводили экспериментально. Известно, что $N_{\text{хром}} < N_{\text{кол}}$ и зависит от (k') и $\sigma_{\text{экстра}}$:

$$N_{\text{хром}} = N_{\text{кол}} \cdot \left\{ \frac{V_0(1+k')}{V_0(1+k')} \right\}^2 + N_{\text{кол}} \sigma_{\text{экстра}}^2 \quad (2)$$

Сравнение кривых I б и II а на рис. 4 говорит о том, что суммарная $\sigma_{\text{экстра}}$ для хроматографа «Милихром®А-02» составляет около 3 мкл. Эта величина вполне приемлема для «проектных» колонок с $N_{\text{кол}} \approx 5000$ т. т. и $V_0 \approx 200$ мкл, но ограничивает применение более эффективных колонок или колонок с меньшим свободным объемом.



Рис. 4. Эффективность хроматографа «Милихром®А-02» ($N_{\text{хром}}$) и внеколоночное размытие ($\sigma_{\text{экстра}}$)

I – найденные по уравнению (2) зависимости $N_{\text{хром}}$ соответствующие колонке с $N_{\text{кол}} = 5000$ т. т. и $V_0 = 180$ мкл для трех величин $\sigma_{\text{экстра}}$: 1(а), 2(б) и 3(с) мкл;

II – вычисленные из хроматограммы на рис. 3 значения $N_{\text{хром}}$ для всех веществ смеси; колонку соединяли с инжектором и детектором капиллярами с $L = 50$ мм и $\varnothing_{\text{внут}} = 0,15$ мм (а) и 0,3 мм (б);

III – разделение эфиров бензойной кислоты: 1 – метилбензоат, 2 – этилбензоат, 3 – пропилбензоат, 4 – бутилбензоат, 5 – пентилбензоат. Колонка: 75 мм x 2 мм, Nucleosil 100-5 C18 ($V_0 = 180$ мкл).

Элюент: $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (70:30), $F = 0,15$ мл/мин, $P = 4,2$ МПа, $T = 45$ °С.

Образец: 2 мкл раствора веществ (по 0,5 мг/мл) в CH_3OH

Все хроматографы серии «Милихром» снабжены прецизионными насосами шприцевого типа, поршень которых приводится в движение шаговым электромотором. Выбор этого типа насосов для нашего варианта МК ВЭЖХ обусловлен характерным для него принципиально малым уровнем пульсации потока при малых и средних давлениях без применения специальных

демпферов, а также возможностью их использования не только для подачи элюента в колонку, но и для инжектирования образца. Все насосы имеют шприцы объемом 2,5 мл и обеспечивают скорость элюирования от 1–5 до 600–1000 мкл/мин (в зависимости от модели хроматографа). Одному шагу мотора соответствует вытесняемый поршнем объем, равный 0,05 мкл. Цилиндры шприцев в насосах хроматографов «Милихром 1–5» изготовлены из упрочненного стекла и рассчитаны на $P_{\max} = 5$ МПа. Цилиндры насосов хроматографа «Милихром®А-02» изготовлены из стали 12Х18Н10Т и обладают большой долговечностью при $P_{\max} = 7$ МПа. Скользящее уплотнение между поршнем и цилиндром достигается при помощи кольца из фторопласта-4, постоянно распираемого пружиной.

Хроматограф «Милихром®А-02» имеет в своем составе два насоса (А и В), каждый из которых подает свой раствор. Формирование градиента осуществляется по задаваемой на компьютере программе (таблице) в виде последовательности до 20 отрезков линейных функций изменения концентрации компонента В. Смешивание растворов А и В производится в смесителе пассивного типа, представляющего собой изогнутый «змейкой» отрезок стального капилляра с $\varnothing_{\text{внут}} = 0,5$ мм и $V = 40$ мкл. Об эффективности этого градиентного устройства можно судить из данных рис. 5.

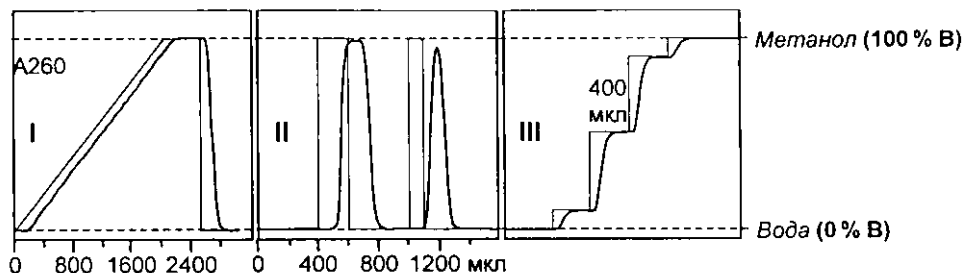


Рис. 5. Градиенты концентраций метанола (В) в воде (А), полученные на хроматографе «Милихром®А-02»

- I – два наложенных друг на друга линейных градиента 0→100 % В с возвратом к 0 % В.
- II – измерение эффективности градиентного насоса по искажению прямоугольных импульсов концентрации CH_3OH шириной 100 и 200 мкл. Для импульса с шириной 100 мкл $\sigma \approx 50$ мкл.
- III – ступенчатый градиент концентрации CH_3OH со ступенями по 400 мкл

Задаваемая форма градиентов показана тонкой линией. Все градиенты регистрировались по поглощению добавленного в метанол уридина (0,5 mM раствор), для чего растворы из инъекционной иглы подавались непосредственно в измерительную ячейку. Скорость потока во всех экспериментах составляла 200 мкл/мин.

В хроматографах «Миличром®А-02», выпущенных после 2000 г., установлены активные смесители с магнитной мешалкой. В отличие от пассивных смесителей, они позволяют надежно формировать градиенты концентрации ацетонитрила в воде, когда исходными растворами А и В служат чистые вода и ацетонитрил.

При проектировании хроматографа «Миличром®А-02», включающего в себя не один, а два насоса, особое внимание уделили проблеме, связанной со сжимаемостью жидкости, характерной для элюирования при помощи шприцевых насосов. Она состоит в том, что после ввода образца в колонку при нулевом давлении, объемная скорость потока подвижной фазы достигает своего заданного значения F постепенно и достигнет его только тогда, когда давление на входе в колонку (P) станет практически постоянным. Строго говоря, постоянной величины оно достигнет через время $t = \infty$, приближаясь к соответствующей величине P_∞ асимптотически, так как одновременно со сжатием элюент вытекает из колонки.

«Эффект сжатия» определяется объемом сжимаемой жидкости (V_P), ее коэффициентом сжимаемости (χ), температурой, зернением адсорбента, скоростью потока и вязкостью элюента. В первом приближении разделение при переменной F можно считать вполне допустимым, так как ЖХ – метод анализа, в котором измерения проводятся относительно внешнего или внутреннего стандарта, чьи пики будут иметь те же самые искажения. Однако, по многим причинам добиться высокой воспроизводимости такого режима хроматографирования представляется задачей весьма сложной. По этой причине было принято компромиссное решение: так как величины $(V_P)_{\max} \approx 5,5$ мл и $V_0 \approx 0,18$ мл уже были определены на предыдущих этапах проектирования хроматографа, то следовало ограничить величину $(P_\infty)_{\max}$ таким образом, чтобы для большинства подвижных фаз скорость потока элюента достигала значения $0,99 F$ раньше, чем начнет элюироваться неупругий компонент образца. В этом случае вклад погрешности, обусловленной переменной скоростью потока, в общую погрешность определения площадей пиков составит $<1\%$.

Проблема применения шприцевых насосов в ВЭЖХ была рассмотрена в статье [9], материалы которой были использованы для вычислений.

При скорости вытеснения элюента из шприца насоса, равной $F_{шпр}$, зависимость величины текущего давления P , стремящегося к заданному давлению P_∞ , от времени t описывается уравнением:

$$P \approx P_\infty \cdot \left[1 - \left(1 - \frac{F_{шпр} \cdot t}{V_P} \right)^{\frac{1}{\chi \cdot P_\infty}} \right], \quad (3)$$

где V_p – полный объем сжимаемого элюента, χ – его коэффициент сжимаемости, а $\Delta V_{\text{шпр}} \ll V_p$. Графически эта зависимость показана на рис. 6, из которого следует, что при $F_{\text{шпр}} = 200$ мкл/мин и $P_\infty = 7$ МПа скорость потока метанола становится практически постоянной через ≈ 1 мин после включения насоса или после вытеснения из шприца первых 200 мкл. Поскольку этот объем близок по величине к свободному объему колонки V_0 , то $P = 7$ МПа следует считать предельно допустимым давлением, если мы хотим элюировать вещества из колонки при $F = \text{const}$.

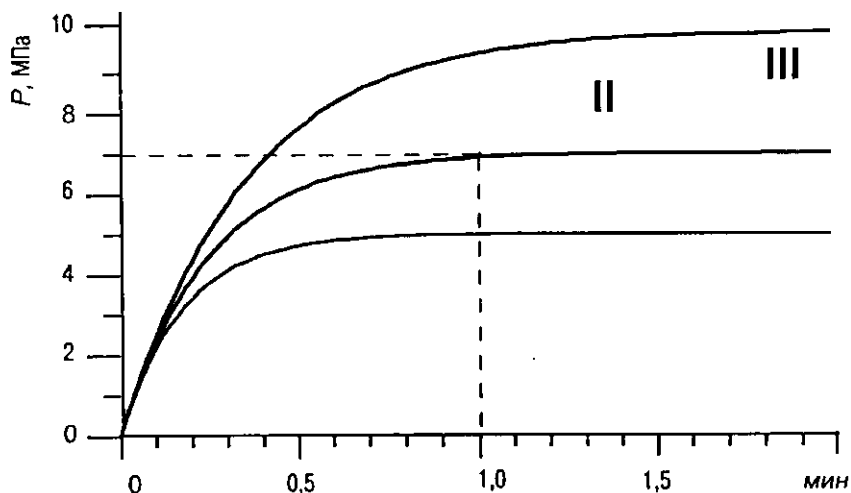


Рис. 6. Зависимости текущего давления P от времени с момента начала элюции, соответствующие уравнению (3):

I – $P_\infty = 5$ МПа;

II – $P_\infty = 7$ МПа;

III – $P_\infty = 10$ МПа;

$V_p = 5,5$ мл;

$F_{\text{шпр}} = 0,2$ мл/мин;

$\chi = 1,25 \text{ кПа}^{-1}$ (CH_3OH , 25°C)

Объем элюата ($V_{0,99}$), вытекшего из колонки к моменту, когда скорость потока через нее составит $0,99 F$ (при $P = 0,99 P_\infty$), находили по уравнению:

$$V_{0,99} \approx V_p (\text{e}^{-\chi \cdot P_\infty} - 0,01 \chi \cdot P_\infty). \quad (4)$$

Зависимости $V_{0,99} = f(P_\infty)$ для 4-х растворителей приведены на рис. 7.

Из них следует, что для начальных условий [$(V_p)_{\max} \approx 5500$ мкл; $V_r > (V_0 \approx 180$ мкл)] значение $(P_\infty)_{\max}$ необходимо ограничить на уровне ≤ 7 МПа. В противном случае малоудерживаемые вещества в смешанных (более вязких) подвижных фазах будут элюироваться из колонки при скорости потока $< 0,99 F$.

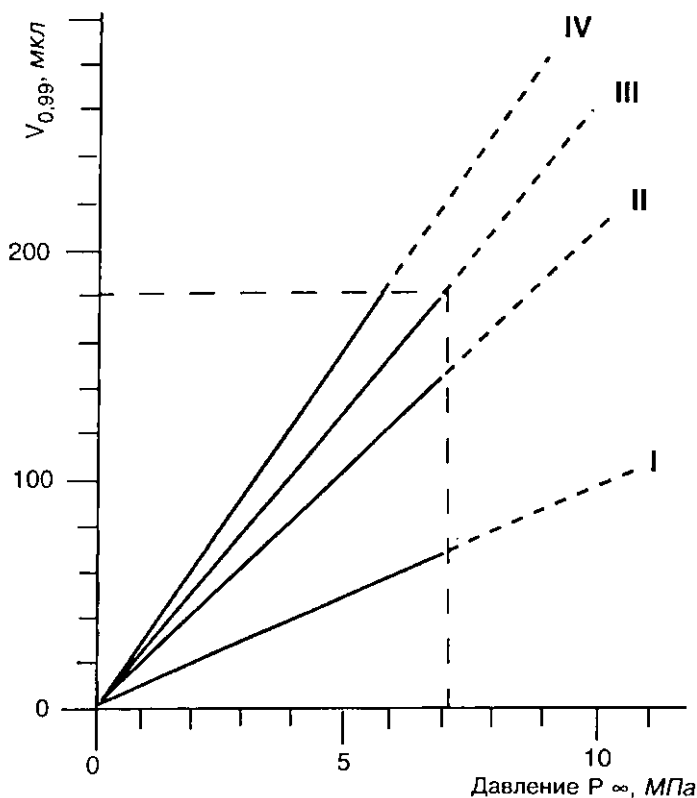


Рис. 7. Зависимости объемов элюатов, вытекших из колонки хроматографа «Милихром®А-02» к моменту установления скорости потока, равной $0,99 F$ от входного давления

I – H_2O ($\chi = 0,46 \cdot 10^{-3} \cdot \text{МПа}^{-1}$);

II – CH_3CN ($\chi = 0,98 \cdot 10^{-3} \cdot \text{МПа}^{-1}$);

III – CH_3OH ($\chi = 1,25 \cdot 10^{-3} \cdot \text{МПа}^{-1}$);

IV – *n*-Гексан ($\chi = 1,61 \cdot 10^{-3} \cdot \text{МПа}^{-1}$).

Вычислено по уравнению (4) для $V_p = 5,5$ мл

В нашем варианте ВЭЖХ определяемые из хроматограмм объемы удерживания веществ $(V_r)_{\text{хром}}$ из-за сжимаемости элюента будут всегда больше истинных величин V_r , которые можно найти из уравнения:

$$V_r = (V_r)_{\text{хром}} - \Delta V = (V_r)_{\text{хром}} - \chi \cdot V_p \cdot P_\infty - \Delta V_{\text{сист}} \approx (V_r)_{\text{хром}} - \chi \cdot V_p \cdot P_\infty \quad (5)$$

где $\Delta V_{\text{сист}}$ – вклад в V_r , обусловленный упругостью элементов гидравлической схемы хроматографа.

Его величина по экспериментальным оценкам для хроматографа «Милихром®А-02» при $P = 7$ МПа не превышает 2–3 мкл. Об этом дополнительно свидетельствует хорошее совпадение экспериментально найденных точек с прямыми $\Delta V = \chi \cdot V_r \cdot P_{\infty}$ для всех 3-х растворителей (см. рис. 8).

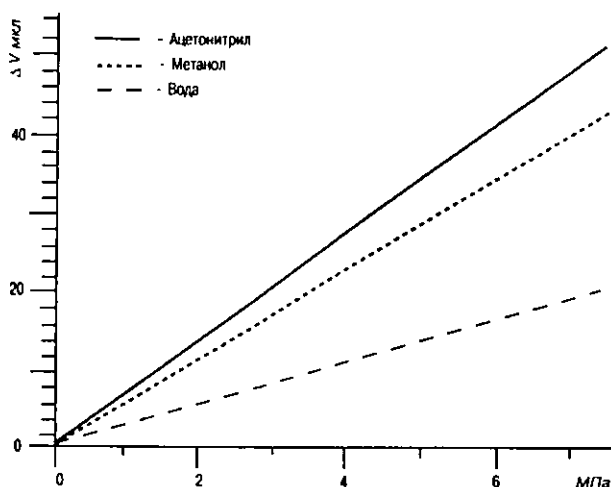


Рис. 8. Экспериментально полученные значения поправок на сжимаемость (ΔV) для некоторых растворителей в зависимости от давления P_{∞} , развиваемого насосами «Милихрома А-02»
 $V_r = 5,5$ мл; $T = 22$ °C

«Милихром®А-02» (рис. 9) является последним и наиболее совершенным в серии «Милихром» хроматографом. Его разработка была выполнена по заказу фирмы «KNAUER GmbH» (Берлин) ЗАО «ЭкоНова» (Новосибирск) совместно с Институтом ядерной физики СО РАН, Лимнологическим институтом СО РАН и Новосибирским институтом биоорганической химии СО РАН. В 1996 г. хроматограф начал серийно производиться в ЗАО «ЭкоНова» совместно с Бердским электромеханическим заводом. Торговое название экспортного варианта хроматографа – «EnviroChrom». Оно отражает возможность использования хроматографа для анализа объектов окружающей среды (*Environment* – англ.) в условиях мобильных или полевых лабораторий.

Это во многом определило такие его качества, как рекордно малые размеры, небольшие масса и потребление электроэнергии, прочность корпуса, моноблочность конструкции. Главное же, благодаря чему «Милихром®А-02» получил статус «полевого» хроматографа, – это принципы МК ВЭЖХ, харак-

терные для всех хроматографов «Милихром». Обычные жидкостные хроматографы из-за большого расхода растворителей в полевую или мобильную лабораторию «вписываются» с большим трудом.

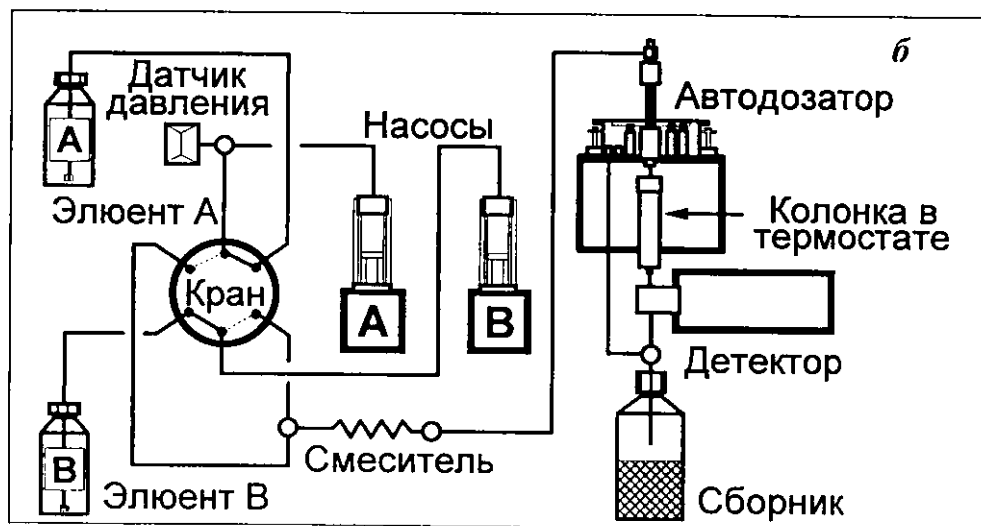
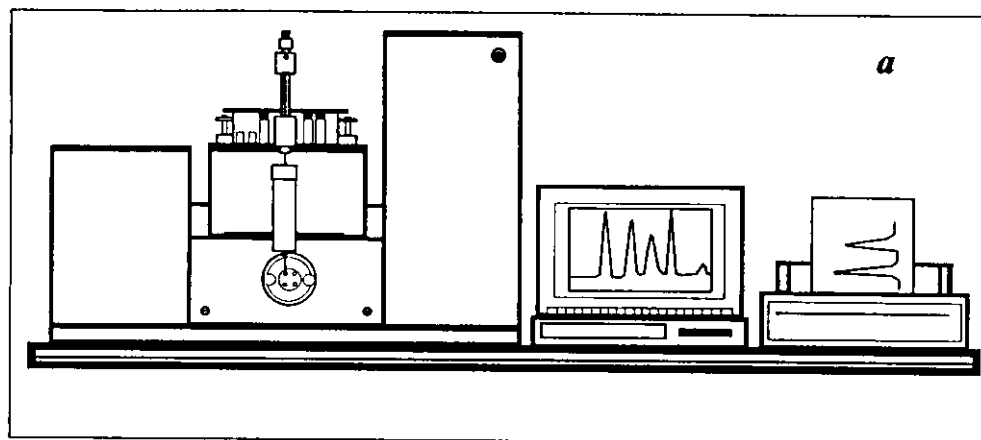


Рис. 9. Хроматограф «Милихром®А-02»

а – комплектация хроматографа с управляющим персональным компьютером типа «Notebook» и принтером;
б – схема устройства

Технические характеристики

КОЛОНКА

Характеристика	Хроматограф «Милихром®А-02»
Длина (L), диаметр (Ø), мм	75 x 2
Свободный объем, мкл, не более	150

ДЕТЕКТОР

Характеристика	Двухлучевой многоволновой автоматический УФ-спектрофотометр
Спектральный диапазон, нм	190–360
Спектральная ширина щели, нм	5
Дискретность установки длины волны (λ) при детектировании и регистрации спектра, нм	2
Погрешность установки длины волны, нм	$\pm 0,005$
Постоянная времени и время измерения поглощения при одной длине волны, с	0,03–10,00
Диапазон измерения поглощения, о. е.	от минус 10 до 10
Объем кюветы, мкл	1,2
Воспроизводимость установки длины волны, нм	0,005
Дрейф нулевого сигнала, АУ/ч, не более	0,0001
Отклонение от линейности в диапазоне от минус 10 до 10, %, не более	1
Уровень шума при $\lambda = 260$ нм и постоянной времени 0,3 с, о. е., не более	0,0002
Размеры измерительной ячейки Z-типа	
длина, мм	1,56
диаметр, мм	1,0
объем, мкл	1,26
Количество длин волн при одновременной детекции	1, 2, 8

АВТОМАТИЧЕСКИЙ ДОЗАТОР

Количество анализов при программировании 46 образцов, не более	200
Объем пробирки для образца, мкл	200
Относительная погрешность дозирования объема 2 мкл, %	2
Инъектируемый объем при шаге 1 мкл, мкл	1–99

НАСОС	
Характеристика	Двухшприцевый, двосенный, дозирующий
Полный объем, мкл	2 x 2500
Скорость потока, мкл/мин	5–999
Абсолютная погрешность скорости потока, %	1
Скорость перезаполнения, мкл/мин	2000
Время полного заполнения, мин	1,7
Максимальное давление, МПа	7
Объем пассивного смесителя, мкл	40
Градиентное элюирование	Кусочно-линейные градиенты (до 20 ступеней)
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ СИСТЕМА	
Количество теоретических тарелок (эффективность колонки), не менее	3500
Диапазон устанавливаемых температур с шагом 1 °С при термостатировании, °С	35–90
Погрешность термостатирования, °С	± 0,1
Воспроизводимость дозирования (средне-квадратическое отклонение):	
– по временам удерживания, %, не более	1
– по площадям пиков, %, не более	1
Потребляемая мощность, Вт	130
Коррозионная устойчивость прибора	сталь 12Х18Н10Т; сапфир; фторопласты, PEEK, Vespel™
Габариты (без компьютера), мм	530 x 200 x 300
Электропитание (без компьютера)	
– напряжение, В	110–120/200–240
– частота, Гц	50/60
– мощность, Вт	100
Масса прибора (без компьютера), кг	17
Программы под операционные системы	WINDOWS 3.1 или WINDOWS-95

Управление хроматографом «Милихром®А-02» осуществляется полностью при помощи компьютера. Подготовка его к работе включает в себя несколько фиксированных «ручных» операций, показанных на рис. 10.

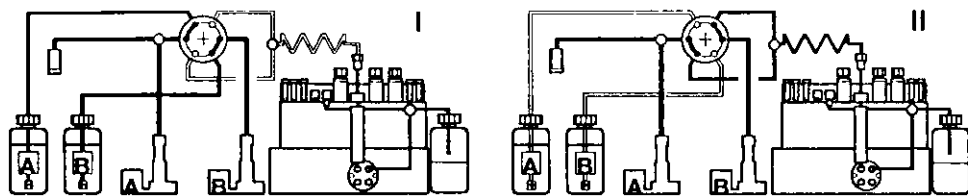


Рис. 10. «Ручные» операции хроматографа «Миличром®А-02»

- I – положение крана «насосы ↔ резервуары». Выполняемые операции:
набор элюентов в шприцы; слив элюентов в резервуары; смена элюентов.
- II – положение крана «насосы ↔ смеситель». Выполняемые операции:
слив растворов из насосов в приемник; промывка инжектора;
промывка иглы инжектора; проверка герметичности системы

Все параметры анализа записываются в файл. Последовательность автоматически выполняемых операций показана на рис. 11.

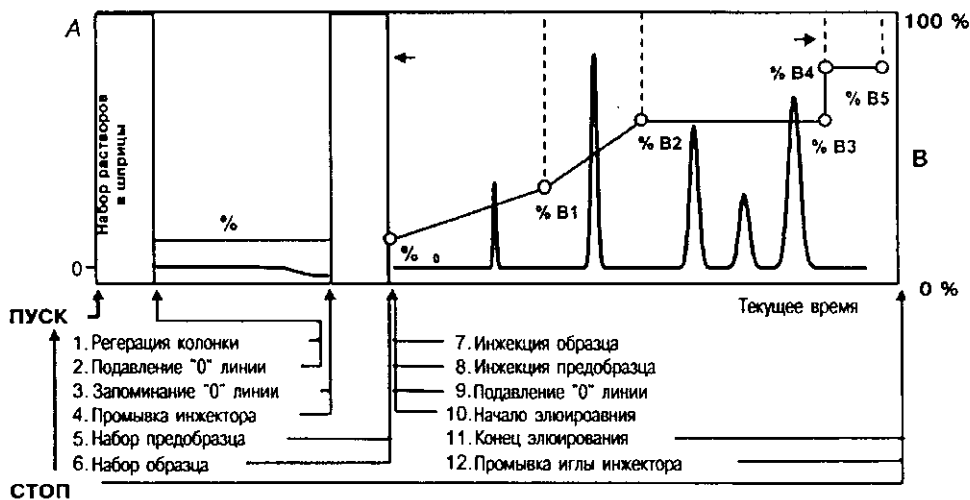


Рис. 11. Последовательность автоматически выполняемых операций во время проведения анализа на хроматографе «Миличром®А-02»

Для каждого анализа серии все задаваемые, кроме температуры колонки, параметры – объемы образца и предобразца, постоянная времени и длины волн детектора, скорость потока, форма градиента – могут иметь свои значения. Результаты автоматически записываются в файл, выводятся на монитор и принтер. Обработка результатов выполняется с помощью сопряженной программы.

В заключение следует отметить, что принципиальные решения, реализованные в конструкции жидкостного хроматографа «Миличром®А-02» полностью себя оправдали. Свидетельством тому являются результаты тща-

тельных испытаний прибора, проведенные специалистами фармакопейного комитета Украины, а также результаты, полученные в лаборатории профессора Энгельгарда, в которых отмечается, что жидкостный хроматограф «Милюхром®А-02» пригоден для любых видов фармакопейного и лабораторного анализа, а метрологические характеристики прибора, такие как воспроизводимость результатов измерения, погрешность дозирования пробы и др., ничем не отличаются от характеристик стандартных приборов производства США и Западной Европы.

Литература

1. *J. G. Cunningham, M. L. Sizeland, H. H. Willis, J. Eakins, E. R. Marcer.* J.Inorg.Nucl.Chem., 1 (1955) 163.
2. *D. C. Stewart.* Analyt.Chem., 27 (1955) 1279.
3. *С. В. Кузьмин, В. В. Матвеев, Е. К. Прессман, Л. С. Сандахчиев.* Биохимия, 34 (1969) 706.
4. *G. Guiochon.* In «High-Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives». C.Horvath (Editor), Vol.2, Academic Press, Inc., 1980, pp.1–59.
5. *M. Martin, C. Eon and G. Guiochon.* J.Chromatogr., 99 (1974), 357; 108 (1975) 229; 110 (1975) 213.
6. *I. Halasz, R. Endelev and J. Asshauer.* J. Chromatogr., 112 (1975) 37.
7. *I. Halasz, H. Schmidt and P. Vogtel.* J. Chromatogr., 126 (1976) 19.
8. *R. P. W.Scott.* Liquid Chromatography Detectors, Elsevier, 1986.
9. *M. Martin, G. Blu, C. Eon and G. Guiochon.* J.Chromatogr., 112 (1975) 399.

*Институт хроматографии;
Лимнологический институт СО РАН
Россия, г. Иркутск;
НПЧФ «Аналитика»
Украина, г. Харьков
e-mail:analytica@analytica.com.ua*

Получено 17.05.04.