

Г. И. БАРАМ

КАКОЙ ХРОМАТОГРАФ САМЫЙ ЛУЧШИЙ?

Вибираючи конкретний прилад для ВЕРХ, необхідно брати до уваги перелік критеріїв, якими бажано при цьому користуватися. Серед них: динамічний діапазон (за чутливістю, тиском, швидкістю потоку, температури термостата); достеменність результатів (одно- або багатопараметрове детектування); надійність (вірогідність відмов); прецизійність (похибка аналізу); продуктивність (кількість аналізів у день); селективність (детектори, колонки); ступінь автоматизації; універсальність; чутливість; економічність (витрата розчинників на один аналіз, необхідність у спеціальному приміщенні, витрати на профілактичне технічне обслуговування).

Choosing the device High performance Liquid Chromatography Practice it is necessary to take into the consideration the list of the main criteria, which are rather be used. These are: dynamic scope (of sensibility, pressure, speed flow, temperature of thermostat); authenticity of result (uni- and poliparametrical detection); reliability (the possibility of refusal); wobbling (analysis mistake); prooluctivity (the quantity of analysis per day; selection (detectors, columns); the level of automation; universality; sensibleness; exploit economics (solvent expense on one analysis, necessity of special rooms, expenses on preventiv technical service).

Вопрос о том, какой хроматограф лучше, мне задавали и задают довольно часто. Задают его люди, как правило, плохо знакомые или совсем не знакомые с ВЭЖХ, но по долгу службы обязанные или желающие использовать этот метод в своей работе. Перед тем, как говорить по существу, я часто отвечаю встречным вопросом вроде такого: “А вы можете назвать самый лучший автомобиль (телевизор, холодильник, магнитофон, стиральную машину и т. д.)?”, после чего наш разговор сразу принимает конструктивный характер. Мне прекрасно понятны затруднения такого человека. Даже имея опыт в отношении знакомых ему устройств, перед жидкостным хроматографом он пасует, думая, вероятно, что оценка его достоинств и недостатков подчиняется какой-то другой логике. Уверяю, что логика здесь должна быть той же – основанной на здравом смысле. Необходимую информацию специального характера, без которой, конечно, не обойтись, можно всегда получить у консультанта или найти в книгах и журналах, но здравый смысл должен быть

собственным. Принцип тот же, что и при покупке автомобиля, телевизора, холодильника.

Казалось бы, рецепт простой, но, как показывает мой опыт, применить его на практике способен не каждый. Даже хорошие специалисты в области ВЭЖХ часто не в состоянии логически обосновать выбор в пользу того или иного хроматографа и более полагаются на свою интуицию. Рецепт простой, но задача не простая. Лет 20 назад было много легче, но хроматография все это время на месте не стояла. Сегодня, пожелав купить хроматограф, мы оказываемся в слишком большом магазине, где представлена продукция многих десятков фирм. Как не растеряться при виде такого изобилия и не поддаваться на призывы броской рекламы? Давайте послушаем диалог между таким же покупателем-новичком и опытным продавцом-экспертом, который руководствуется единственным правилом – если Покупатель купит не то, что ему надо, то в следующий раз он пойдет в другой магазин.

Покупатель: Здравствуйте! Я бы хотел выбрать жидкостный хроматограф и прошу Вас о помощи. Жидкостную хроматографию знаю лишь в общих чертах и не хотелось бы выбросить деньги на ветер. Количество предлагаемых приборов такое большое, что я, признаться, растерялся.

Эксперт: Добро пожаловать! Рад, что Вы обратились именно к нам. Постараюсь Вам помочь, но для этого Вам тоже придется потрудиться. Давайте поступим таким образом: я буду задавать вопросы и Ваши ответы мы запишем. В конце беседы, прочитав ответы, я постараюсь назвать хроматограф, отвечающий Вашим пожеланиям в максимальной степени. Если согласны, то начнем. Первый вопрос: «Какие задачи Вы собираетесь решать при помощи хроматографа: аналитические или препаративные? А может быть, и те и другие?»

Покупатель: Было бы заманчиво иметь универсальный хроматограф, но здравый смысл подсказывает, что он будет не только дорогим, но и менее удобным. Давайте говорить об аналитическом приборе.

Эксперт: А для каких целей Вам может понадобиться препаративная хроматография?

Покупатель: Главным образом, для определения структуры неизвестных веществ или идентификации пиков веществ, которых может не оказаться в качестве стандартов. Я предполагал в таких случаях выделять 10–20 мкг чистого вещества и исследовать его методом электронной и масс-спектрометрии, а также проверять его реакционную способность по отношению к различным реагентам.

Эксперт: Если Вам для этого достаточно всего 10–20 мкг вещества, то с таким количеством справиться любой аналитический хроматограф с колонкой объемом 0,2–2 мл. Важно только при таком микропрепаративном разделении использовать неразрушающий детектор. Теперь следующий вопрос: «Насколько разнообразны Ваши аналитические задачи?»

Покупатель: А как это может быть связано с конкретной моделью хроматографа?

Эксперт: Дело в том, что существует довольно много специализированных хроматографических анализаторов, предназначенных для выполнения какого-либо одного типа анализа. Например, для анализа аминокислот, для эксклюзионной хроматографии полимеров, для анализа ионов, для разделения биологически активных веществ. Каждый из них оптимизирован, поэтому для решения узких задач их применение, конечно, предпочтительнее. На универсальном хроматографе любая из узких задач тоже решается, но, разумеется, не так быстро и просто.

Покупатель: Понятно. Так как мои интересы весьма широки, то мне придется выбрать хроматограф универсального назначения.

Эксперт: Другими словами, Вам нужен «обычный» хроматограф для Высоко-Эффективной Жидкостной Хроматографии (ВЭЖХ). Если мы с этим определились, то настало время задать самый сложный вопрос: «Насколько сложные смеси Вы собираетесь разделять или, говоря на языке хроматографии, сколько компонентов в образце Вы собираетесь определять одновременно?»

Покупатель: Исходя из общих соображений, сказать трудно. Хотелось бы иметь запас мощности, хотя я понимаю, что должен быть разумный предел. Если обратиться к здравому смыслу, то обычно меня интересует только одно вещества, иногда – два-три и уже совсем редко – до 15. А что посоветуете Вы?

Эксперт: Названные Вами цифры вполне отражают современное состояние рутинного химического анализа. Конечно, кто не хочет иметь анализатор, способный справиться со всеми известными веществами одновременно (но их количество перевалило за несколько миллионов, и решение такой грандиозной задачи – сюжет для фантастического романа). На практике, речь идет всегда об определении группы веществ одного класса, которые перед анализом необходимо выделить из сложного образца. Это соображение, сужающее круг одновременно определяемых веществ, касается возможностей самой хроматографии. Любая конкретная комбинация фаз – неподвижной, подвижной – предназначена для разделения вполне определенных, а не произвольных веществ. Например, ионообменную хроматографию нельзя применить для анализа хлорбензолов, легко разделяемых методом обращенно-фазной ВЭЖХ, но этот метод, в свою очередь, бесполезен, для определения неорганических анионов. Есть и второе соображение. Количество одновременно определяемых веществ должно диктоваться не возможностями техники, а тем же здравым смыслом, которым следует руководствоваться при постановке задачи. Из литературы следует, что исследователи чаще всего определяют в образце всего одно вещество, реже – 2–3 и совсем редко – 5–10 соединений. Большое количество веществ характерно лишь для аминокислотного анализа и ферментативного картирования пептидов. Вы, конечно, часто видите в статьях хроматограммы с множеством пиков, но они

чаще всего приводятся специалистами в области ВЭЖХ как иллюстрация разделяющей способности колонок и к практической рутинной ВЭЖХ отношения не имеют. Вопрос о количестве одновременно определяемых веществ я Вам задал совсем не случайно. Он прямо связан с длиной хроматографической колонки.

Покупатель: А почему это имеет значение?

Эксперт: Дело в давлении, которое должна развивать ваша насосная система. Чем короче колонка, тем меньшее давление требуется для продавливания через нее подвижной фазы с заданной линейной скоростью. Создание давления – проблема сугубо техническая и успешно решаемая. Современные сорбенты допускают долговременную эксплуатацию при давлениях до 20–40 МПа, что позволяет работать с колонками длиной 500–1000 мм, способными разделить 200–300 веществ. Но если Вы ограничите свой аппетит разрешающей способностью в 50 веществ, то Вам потребуется колонка длиной всего 60–80 мм и, соответственно, рабочее давление 4–6 МПа.

Покупатель: Но чем мне помешает запас по давлению, даже если я буду использовать 10–15 % мощности насоса?

Эксперт: Позвольте воспользоваться аналогией с автомобилем. Очевидно, что если его сделали для передвижения со скоростью 100 км/ч, то при 10 км/час он превратится в печь для сжигания денег. Это справедливо и по отношению к хроматографу. При низком давлении характеристики его насоса заметно ухудшатся: увеличится погрешность скорости подачи подвижной фазы, станут заметнее пульсации потока. В конечном счете, возрастет погрешность результатов анализа.

Покупатель: С технической точки зрения преимущества низкого давления для меня очевидны – и конструкция проще, и надежность выше. Но если я сделаю выбор в пользу коротких колонок, то вернуться к длинным уже не смогу. А как быть, когда возникнет проблема разделения очень похожих веществ, которые на короткой колонке разделяются плохо?

Эксперт: Вопрос резонный. Но еще в середине 70-х годов многими авторами было показано, что увеличение разрешающей способности колонки за счет увеличения ее длины – путь не очень рациональный. Дело в том, что практически разрешающую способность целесообразно повышать не менее чем в 2 раза, что требует удлинения колонки в 4 раза. Цена такого решения оказывается весьма высокой. Судите сами:

- в 4 раза увеличится время анализа;
- в 4 раза возрастет давление;
- потребуется в 4 раза больше подвижной фазы;
- в 2 раза уменьшится высота пиков, а, значит, и чувствительность анализа.

Тогда же, в середине 70-х годов, авторитеты пришли к выводу, что оптимальная длина колонки для рутинной ВЭЖХ должна составлять 50–70 мм, а бороться за улучшения разрешения пиков следует не удлинением колонки,

а увеличением селективности. В отличие от газовой хроматографии, жидкостная хроматография позволяет это делать в широчайших пределах.

Покупатель: Считайте, что Вы меня убедили. Но почему, насколько мне известно, наиболее популярными в мире до сих пор являются колонки длиной 200–250 мм?

Эксперт: Причина историческая и экономическая. ВЭЖХ начиналась с колонок длиной 500–1000 мм, и в погоне за сокращением времени анализа главное внимание уделяли повышению давления. Конструкторы здесь добились очень хороших результатов благодаря переходу к насосам, в которых нагнетание подвижной фазы в колонку осуществлялось за счет возвратно-поступательного движения плунжера. В середине 70-х годов почти все хроматографы имели насосы такого типа, работающие при давлении 40–60 МПа. С принципиальным недостатком таких насосов – пульсациями потока, синхронными движению плунжера и работе клапанов – научились бороться при помощи различных демпферов и путем увеличения количества камер, в которых плунжеры двигаются со сдвигом по фазе подобно поршням в многоцилиндровых автомобильных двигателях. Наука на месте не стояла, и постепенно научились делать более короткие хроматографические колонки, разделительная способность которых была существенно выше, чем у их длинных предшественниц, и высокие давления стали уже не нужны. Сегодня «стандартная» колонка имеет длину 200–250 мм, а «стандартное» давление составляет 10–15 МПа. Казалось бы, можно продолжать укорачивать колонку и снижать давление, но этому мешают плунжерные насосы. Если при давлении 10 МПа их пульсации подавлять умеют хорошо, то при давлении 5 МПа это пока удается с трудом. Таким образом, ВЭЖХ попала в замкнутый круг:

- 5 лет назад Вы купили «стандартный» хроматограф;
- для работы Вы покупали различные «стандартные» колонки и разрабатывали «стандартные» методики анализа;
- приходит пора менять хроматограф и Вы, обремененные запасом «стандартных» колонок и пакетом «стандартных» методик, вынуждено покупаете новый «стандартный» хроматограф.

Однако, преимущества коротких колонок настолько очевидны, что постепенно, хотя и очень медленно, они вытесняют длинные. Если 10–15 лет назад практически все применяли колонки длиной 250 мм, то сейчас многие предпочитают колонки длиной 150 мм. Конечно, это стимулирует конструкторов создавать более совершенные насосы, которые, в свою очередь, позволяют аналитикам продолжать уменьшать длину колонок. В заключение скажу, что без пульсаций работают насосы шприцевого типа, но они экономически оправдывают себя при эксплуатации с колонками, объем которых не превышает 1 мл. Такие колонки не являются «стандартными», и производство шприцевых насосов пока ограничено. Я говорю «пока», так как уверен, что скоро они будут уверенно конкурировать с плунжерными насосами.

Покупатель: Спасибо за обстоятельный ответ. Поскольку я, как Вы ска-
зали, не обременен запасом длинных колонок и пакетом «стандартных» ме-
тодик, то мне терять нечего и я смело выбираю короткие колонки.

Эксперт: Тогда следующий важный вопрос, касающийся масштаба
ВЭЖХ, в котором Вам предстоит работать. Он определяется объемом хрома-
тографической колонки и типом ВЭЖХ, которые условно можно обозначить
таким образом:

- обычная ВЭЖХ (объем колонки – 1–5 мл);
- полумикро-ВЭЖХ (объем колонки – 0,1–1 мл);
- микро-ВЭЖХ (объем колонки – 0,01–0,1 мл).

От объема колонки пропорционально зависит количество подвижной фа-
зы, необходимое для хроматографического анализа – чем меньше колонка,
тем меньше растворителя Вам потребуется. Что касается обычной ВЭЖХ, то
расход подвижной фазы на один анализ составляет около 10–20 мл.

Покупатель: Не думаю, что для меня такое количество может оказаться
существенным.

Эксперт: А сколько анализов в год Вы планируете сделать, или, проще
говоря, сколько часов в день ваш хроматограф будет работать?

Покупатель: Надеюсь, что полный рабочий день, т. е. не менее 6 ч.

Эксперт: Давайте посчитаем, во что превращаются 20 мл растворителя,
необходимые для одного анализа, выполняемого в течение 6 ч ежедневно,
т. е. за год, в среднем, за 1200 ч. При скорости потока 1 мл/мин (60 мл/ч)
в год Вам потребуется 72 л растворителя. Если же Вы войдете во вкус и Ваш
хроматограф будет работать по 24 ч в сутки, то это количество возрастет
примерно до 300 л. Учитывая, что речь идет о специально очищенных раст-
ворителях для ВЭЖХ, то стоимость 300 л составит немалую сумму. Посмот-
рите на приведенные в таблице данные о стоимости некоторых растворите-
лей.

Стоимость некоторых растворителей для ВЭЖХ в 1996 г.

| ФИРМА (страна) | Цена 1 л (300 л) растворителя, \$ США | | | |
|----------------------|---------------------------------------|-------------|--------------|----------------------|
| | Вода | Метанол | Ацетонитрил | Тетрагид- рофуран |
| Fluka (Швейцария) | 9,6 (2880) | 14,3 (4290) | 51,2 (15360) | 70,7 (21210) |
| Sigma (США) | 18,4 (5520) | 20,6 (6180) | 38,1 (11430) | 45,2 (13560) |
| Криохром (Россия) | – | – | 14,6 (4380) | – |

Добавьте сюда еще расходы по транспортировке, хранению и утилизации
этих токсичных и горючих жидкостей, исключая, конечно, воду. Если Вы
покупаете хроматограф на 5 лет, то стоимость растворителей за это время
как раз сравняется с ценой хроматографа.

Покупатель: Да, вывод неожиданный! В таком случае, почему бы мне не выбрать для себя микро-ВЭЖХ и избавиться от этих проблем раз и навсегда?

Эксперт: Микро-ВЭЖХ Вас, конечно, от этих проблем избавит, но создаст новые. Применение микроколонки требует соответствующей миниатюризации всего её окружения. Приходится иметь дело с капиллярами, которые, имея внутренний диаметр всего 0,1 мм, перестают протекать из-за попадания в них мельчайших соринки; детекторы с измерительными микроячейками имеют худшие параметры, по сравнению с обычными; в микрообъеме труднее осуществлять градиентное элюирование; труднее добиться заданной скорости потока подвижной фазы, так как даже незначительная (не видимая глазом) для обычной ВЭЖХ течь элюента, возникающая из-за недостаточной герметичности какого-нибудь соединения, в случае микро-ВЭЖХ уже недопустима.

Еще одно соображение не в пользу микро-ВЭЖХ связано с общим принципом: при уменьшении объема происходит относительное увеличение поверхности контакта раствора со стенками сосуда и, тем самым, в большей мере проявляются эффекты, связанные с взаимодействием компонентов раствора с молекулами материала стенок. Вот какие трудности подстерегают любителей микро-ВЭЖХ.

Именно по этим причинам такой внешне привлекательный метод пока широкого распространения не получил. Если же говорить о полумикро-ВЭЖХ, то названные выше проблемы для этого варианта ВЭЖХ не столь актуальны. Те полумикро-хроматографы, которые представлены в нашем магазине, по своим метрологическим и эксплуатационным характеристикам от своих «стандартных» собратьев почти ничем не отличаются.

Покупатель: Уговорили. Ежегодная экономия более 5000 долларов в год – весомый аргумент! Запишите меня в клуб полумикро-ВЭЖХ.

Эксперт: Теперь поговорим о детекторах. Если насос – сердце хроматографа, то детектор – его глаза. Вы хотите купить универсальный хроматограф и Вам никак не обойтись без УФ-спектрофотометрического детектора. С его помощью можно решать практически все задачи, включая определение веществ, не поглощающих УФ-излучение. Для таких случаев применяют метод косвенного детектирования. Я не советую Вам пока приобретать другой универсальный высокочувствительный детектор – масс-спектрометр. Для рутинного анализа он слишком дорог и сложен. Что касается УФ-фотометра, то следует отметить, что, при анализе некоторых классов соединений его чувствительность несколько ниже по сравнению с чувствительностью таких более селективных детекторов, как электрохимический (определение биогенных амина, фенолов), флюориметрический (определение полициклических ароматических соединений и других флюоресцирующих веществ), кондуктометрический (определение катионов и анионов). Хотите ли Вы иметь хроматограф с несколькими детекторами?

Покупатель: Если речь идет только о некотором увеличении цены, то, пожалуй, кондуктометр и флюориметр мне бы не помешали.

Эксперт: Цена хроматографа с несколькими детекторами, безусловно, возрастет, но я должен сделать одно важное замечание. Преимущества названных детекторов перед УФ-фотометром начинают заметно сказываться при концентрации анализируемых веществ ниже 1 мг/л. Это уже относится к области высокочувствительного анализа и к нему всегда следует тщательно готовиться, начиная с приготовления растворов из особочистых компонентов и кончая калибровкой прибора по стандартам.

Неправильно думать, что при высокочувствительном анализе переход от одного детектора к другому осуществляется только нажатием соответствующей кнопки. Если ли же эта область аналитической химии для Вас представляет лишь абстрактный интерес, то селективные детекторы могут оказаться полезными лишь для получения дополнительной информации о гомогенности пиков, зарегистрированных по УФ-поглощению.

Покупатель: В таком случае я отложу решение этого вопроса на будущее, пока не появятся соответствующие задачи, а сейчас ограничусь одним УФ-фотометром. Но я вижу, что ассортимент их очень большой.

Эксперт: Да, их действительно очень много. Однако, попробуем сначала выбрать интересующую Вас группу (из следующих семи):

1. УФ-фотометры с ртутной лампой на одну длину волны $\lambda = 254$ нм.
2. УФ-фотометры с набором фильтров на несколько длин волн.
3. УФ-спектрофотометры с фиксируемой для всего анализа длиной волны – любой из полного диапазона.
4. УФ-спектрофотометры с возможностью переключения длины волны на разных участках хроматограммы.
5. Сканирующие УФ-спектрофотометры с возможностью записи УФ-спектра после остановки потока элюента.
6. Сканирующие УФ-спектрофотометры с быстрым циклическим переключением нескольких длин волн в процессе разделения и с возможностью записи спектра после остановки потока.
7. УФ-спектрофотометры с диодной матрицей, которые регистрируют поглощение сразу при 250–500 длинах волн через короткие промежутки времени.

В этом списке детекторы расположены в порядке возрастания их информационных возможностей, сложности и, соответственно, стоимости.

Покупатель: Прямо глаза разбегаются. Без Вашей помощи, боюсь, мне не справиться. Думаю, что выбирать надо из последних трех групп, так как перспектива получения спектров веществ мне представляется очень ценной для надежной идентификации пиков. Объясните только, пожалуйста, разницу между детекторами из 6 и 7 групп. По-моему, детекторы с диодной матрицей предпочтительнее, потому что они могут все.

Эксперт: За это «все» приходится платить и не только в денежном выражении. Главное – они обладают меньшей чувствительностью, особенно когда измерительная ячейка должна иметь маленький объем. Для Вас это важно. Помните, что Вы записаны в члены клуба полумикро-ВЭЖХ.

Второе предостережение, что парадоксально, касается их основного достоинства – огромного объема выдаваемой информации. Каждая хроматограмма легко превращается в массив из тысяч спектров и очень трудно удержаться от соблазна все эти данные хранить и пытаться осмыслить. Если говорить о здравом смысле, то мне еще не встречались практически значимые задачи, которые бы решались с помощью матричного детектора, и не решались бы при помощи детектора из шестой группы. Вспомните, что полосы поглощения в УФ-области спектра весьма широкие и совсем не обязательно описывать их сотней точек. Как правило, достаточно всего 2–5 длин волн, специфических для конкретного вещества, чтобы вполне однозначно его охарактеризовать.

Покупатель: А что Вы скажете о надежности детекторов из группы 6? Насколько я понимаю в технике, переключение длин волн в них осуществляется механическим образом и это должно принципиально снижать надежность устройства.

Эксперт: Здесь Вы правы, но до определенной степени. Думаю, что надежность переключаемых детекторов не хуже, чем надежность хороших механических часов, печатных машинок, принтеров, самописцев, магнитофонов, фотоаппаратов и прочей «механики», которая окружает нас повсеместно. С другой стороны. Вам приходилось, наверняка, видеть неработающие телевизоры, радиоприемники, калькуляторы и другую «чистую» электронику.

Покупатель: С Вашими аргументами спорить трудно. Запишите в свой листок, что я выбираю УФ-спектрофотометр из шестой группы.

Эксперт: Таким образом, Вы приобретаете не один, а много детекторов сразу. Судя по всему, Вы не полностью оценили преимущества быстрых спектрофотометров перед спектрофотометрами из групп 4 и 5. Одновременное детектирование при нескольких длинах волн равносильно одновременному использованию нескольких одноволновых фотометров. Такой способ называется многопараметровым детектированием и он существенно повышает достоверность результатов анализа. На одноволновой хроматограмме идентификация пика осуществляется только путем сравнения его времени удерживания со временем удерживания пика стандарта. Когда же веществу на хроматограмме соответствуют несколько пиков при разных длинах волн, то в качестве критерия идентификации можно использовать еще и значения относительных высот или площадей этих пиков. Если хотя бы одно из них не совпадет со стандартным, то ищите причину. Очень может быть, что Вы встретились с другим веществом.

Покупатель: Приятный сюрприз! Спасибо.

Эксперт: Для того, чтобы закончить с детектором полностью, нам необходимо выяснить требования к его быстродействию. Если Вы планируете заняться скоростной хроматографией, то Вам потребуется детектор с очень маленькой постоянной времени.

Покупатель: А что Вы называете «скоростной» хроматографией?

Эксперт: В настоящее время это соответствует около 10 пиков/мин, тогда как обычная ВЭЖХ обеспечивает скорость анализа примерно 1 пик/мин.

Покупатель: Внутренний голос мне подсказывает, что большой необходимости в «моментальных» анализах в обозримое время не предвидится.

Эксперт: Задам еще один важный вопрос, от которого во многом зависит цена хроматографа. Какая погрешность анализа Вас удовлетворит? Понятно, что чем она меньше, тем хроматограф дороже.

Покупатель: Эта проблема мне знакома по другим методам анализа. С одной стороны, хочется, чтобы она была минимально возможной, а с другой – я понимаю, что она должна быть соизмерима с погрешностью другой измерительной лабораторной техники – пипеток, весов, мерной посуды. Из этих соображений меня вполне бы устроила относительная погрешность хроматографического анализа, равная 2–5 %.

Эксперт: Вы попали прямо в «золотую» середину. Относительная погрешность параметров удерживания и площадей пиков для самых простых и дешевых хроматографов обычно составляет 5–10 %, а для самых прецизионных и дорогих – 0,5–2 %. Теперь перейдем к более конкретным вопросам, касающихся конфигурации хроматографа.

Сначала о насосе. Здесь есть три варианта, которые я перечислю в порядке возрастания возможностей, сложности и цены:

1. Один насос для изократического элюирования (элюирование подвижной фазой с постоянным составом).

2. Один насос, на входе которого установлены управляемый клапан; переключающий (по очереди) 2, 3 или 4 раствора и смеситель, в котором эти растворы смешиваются. Образующаяся в смесителе подвижная фаза определенного состава подается насосом в колонку. Такое устройство называют градиентным насосом с формированием градиента концентрации компонентов подвижной фазы в линии низкого давления. Форма градиентной кривой задается заранее с помощью контроллера, который управляет клапаном, обеспечивая необходимую пропорциональность смешивания исходных растворов.

3. Два насоса, каждый из которых подает свой элюент в смеситель, где они смешиваются и далее поступают в колонку. Насосы управляются контроллером, который, изменяя скорость каждого насоса согласно заданной программе, суммарную скорость потока поддерживает постоянной. Этот насос называют градиентным насосом с формированием двухкомпонентного градиента в линии высокого давления. По такому же принципу можно ском-

поновать и большее число насосов для получения многокомпонентных градиентов.

Покупатель: Здесь чувствуется какой-то подвох. Разумеется, я не хочу ограничивать себя только возможностями изократического элюирования, и мне, конечно, нужен градиентный насос, но преимущества насоса № 2 настолько очевидны, что о третьем типе можно было бы и не говорить. Или я не прав?

Эксперт: Подвоха никакого нет. Дело в том, что формирование градиента с помощью одного насоса требует активного смесителя довольно большого объема. Ведь растворы попадают в него не одновременно, а по очереди. Для того, чтобы получить соотношение растворов 1:99, надо позаботиться о том, чтобы смеситель вместил в себя оба этих объема и успел их перемешать. Однако, если объем смесителя окажется слишком большим, то следующая порция раствора изменит это соотношение и фактический состав подвижной фазы будет заметно отличаться от заданного по программе. Другими словами, при формировании градиента в линии низкого давления с помощью одного насоса получить хорошее соответствие между заданной и фактической формой градиента весьма трудно. Кроме того, «сглаживание» формы градиента происходит и во время прохождения подвижной фазы через насос, который является дополнительным смесителем. При работе с колонками большого объема получать хорошо воспроизводимые пологие градиенты концентраций научились, но для маленьких колонок проблемы еще остались. Более того, добавилась еще проблема задержки градиента. Так как смешивание происходит на входе насоса, то пока этот элюент дойдет до колонки, проходит немало времени, которое, в конечном итоге, увеличивает продолжительность самого анализа.

Покупатель: Будем считать, что очередные рифы мы миновали. Как будущий член клуба полумикро-ВЭЖХ, я просто вынужден выбрать двухнасосную систему.

Эксперт: Идем дальше. Потребуется ли Вам автоматический дозатор образцов или Вы предпочтете каждый анализ выполнять вручную?

Покупатель: Уверен, что автоматический режим работы я буду использовать часто. Тем более, когда днем придется готовить образцы, на анализ которых времени уже не останется. В отличие от человека, хроматографу спать не обязательно.

Эксперт: В каком виде Вам больше нравится получать результаты анализа – сами хроматограммы: на ленте самописца, или напечатанные при помощи специального электронного интегратора, или в виде компьютерного файла?

Покупатель: Конечно, в виде файла. А что, есть основания для сомнений?

Эксперт: Они касаются исключительно финансового вопроса. Цена всех трех устройств вполне соизмерима, но стоимость программного обеспече-

ния для компьютера довольно высока. Некоторые специалисты для большей уверенности и надежности используют самописец в качестве независимого и дополнительного к компьютеру регистратора.

Покупатель: Подозреваю, что они делают это не по необходимости, а по традиции. Подключать дополнительный регистратор я считаю излишним.

Эксперт: А что Вы скажете об управлении хроматографом? Его можно осуществлять при помощи традиционного пульта с набором соответствующих кнопок, а можно – при помощи того же персонального компьютера.

Покупатель: Когда есть компьютер, то пульт (как и самописец) выглядит анахронизмом. Вы, надеюсь, согласны?

Эксперт: Не совсем. Представьте себе, что у Вас не один хроматограф, а пять. Каждый из них может управляться с помощью своего пульта, но сигналы от всех пяти детекторов поступают в один компьютер. В противном случае Вам придется покупать пять компьютеров и пять комплектов полного программного обеспечения, включающего в себя управляющую программу. Дороговато, да и компьютеры займут много места. Здесь и самописцы могут пригодиться для оперативного контроля за ходом анализа на каждом приборе.

Покупатель: Об этом я действительно не подумал и Вы правы. В свое оправдание лишь скажу, что для меня это пока не актуально.

Эксперт: Осталось задать еще три вопроса. В каком исполнении Вы хотите иметь свой хроматограф: в стационарном или в транспортабельном?

Покупатель: Неожиданный вопрос и странный. Какая необходимость может заставить меня куда-нибудь переносить или перевозить хроматограф?

Эксперт: Это зависит от задач, которые Вы собираетесь решать. Существуют же полевые, автомобильные, корабельные и железнодорожные (в вагоне) аналитические лаборатории. Даже тогда, когда предназначенные для анализа образцы в большом количестве надо привозить в лабораторию издалека, может оказаться экономически выгоднее приехать самому вместе с хроматографом.

Покупатель: О такой возможности я, честно признаюсь, и не подозревал. Те хроматографы, которые я видел, транспортабельными назвать никак нельзя. Они не только тяжелые и громоздкие, но и опутаны множеством капилляров и проводов, которые надо перед транспортировкой разъединять, а затем на месте опять соединять. Да и запас растворителей требуется изрядный.

Эксперт: Вы забыли, что выбрали для себя метод полумикро-ВЭЖХ на коротких колонках, и много растворителей Вам не понадобится. Масса такого полумикро-хроматографа не превысит 20 кг, а по размерам он не больше персонального компьютера в корпусе «minitower» без монитора. Что касается управляющего компьютера, то для маленького хроматографа целесообразно приобрести маленький компьютер типа «notebook».

Покупатель: А что Вы можете сказать о метрологических и эксплуатационных характеристиках такого маленького хроматографа по сравнению

с прибором обычных размеров? Не ухудшились ли они в результате миниатюризации?

Эксперт: Главные характеристики мы с Вами уже обсудили, и всё то, что Вы сами выбрали, в портативном хроматографе реализовано полностью.

Покупатель: Сколько же стоит такая игрушка? Наверное, как и компьютер «notebook» по сравнению с настольным, он дороже обычного в 2–2,5 раза?

Эксперт: Нет, здесь Вы ошиблись. Портативный хроматограф даже немного дешевле своего «большого брата».

Покупатель: Решено! Портативный хроматограф мне нравится. Но остались еще два вопроса, которые Вы собирались задать.

Эксперт: Вы на них уже ответили, когда выбрали портативный хроматограф. Я хотел спросить о том, какое исполнение хроматографа – блочное или в виде моноблока – Вы предпочтете. Портативный прибор, конечно же, должен быть моноблоком, чтобы не разбирать и собирать его каждый раз во время научного путешествия.

Последний вопрос предполагался о конструкции термостата для колонки. Возможны три варианта:

- без специального термостата (его заменяют рубашкой, через которую прокачивается вода из водяного термостата);
- с воздушным термостатом;
- с твердотельным термостатом.

Для портативного хроматографа приемлем практически только твердотельный термостат, как самый экономичный и малогабаритный.

Мне остается только поздравить Вас с полезным приобретением и пожелать успехов.

Покупатель: Да, беседа оказалась очень полезной. Никогда не думал, что выбор хроматографа – такая непростая задача. Сколько же развилков мы миновали, прежде чем Вы привели меня к финишу?

Эксперт: Много. Сегодняшний уровень ВЭЖХ таков, что есть из чего выбирать. Могу предложить Вашему вниманию перечень основных критериев, которыми желательно руководствоваться при выборе конкретного хроматографа.

Мы с Вами обсудили далеко не все. Чтобы не думать о приоритетности этих критериев, я привожу их в алфавитном порядке:

- **динамический диапазон** (по чувствительности, давлению, скорости потока, температуре термостата);
- **достоверность результатов** (одно- или многопараметровое детектирование);
- **доступность** (возможность быстрой поставки после оплаты);
- **дружественность** (соответствие требованиям GLP - Good Laboratory Practice);

- живучесть (сохранение работоспособности при небольших неисправностях);
- надежность (вероятность отказа);
- портативность (транспортабельность, возможность эксплуатации в темных помещениях);
- преемственность методического обеспечения;
- препаративные возможности;
- престижность (может иметь значение для крупных и богатых лабораторий);
- прецизионность (погрешность анализа);
- привычность (традиционность как самого устройства, так и управления);
- производительность (количество анализов в день);
- разрешающая способность;
- селективность (детекторы, колонки);
- сложность (конструкция, управление, техническое обслуживание);
- совместимость с другим лабораторным оборудованием;
- степень автоматизации;
- стоимость (включая доставку и гарантию);
- универсальность;
- уровень обслуживания (гарантия, оперативный ремонт);
- чувствительность;
- экологическая безопасность (уровень загрязнения окружающей атмосферы);
- экономичность при эксплуатации (расход растворителей на 1 анализ, необходимость в специальном помещении, расходы на профилактическое техническое обслуживание).

Покупатель: Да, но как называется хроматограф, который я собираюсь купить? Вы его не назвали.

Эксперт: О! Простите меня за рассеянность. Портативный хроматограф, который Вам понравился, называется «Милихром®А-02». Его техническое описание и примеры, иллюстрирующие возможности полумикро-ВЭЖХ, Вы найдете в книге «ВЭЖХ для ВСЕХ».

Если Вам понадобится дополнительная информация о принципах выбора хроматографа, то могу посоветовать прочесть работы [59–61].

Прежде, чем с Вами попрощаться, позвольте подарить на память схему, по которой мы двигались как по карте. Ваши ответы я выделил в ней жирным шрифтом. До свидания.

ХРОМАТОГРАФИЯ

Препаративная
хроматография

Аналитическая
хроматография

Специализированные
анализаторы:

ГПХ полимеров
Ионная хроматография
Аминокислотный анализ
ЖХ биологически-активных
макромолекул

УНИВЕРСАЛЬНЫЙ
ХРОМАТОГРАФ
ДЛЯ ВЭЖХ

- "обычная" ВЭЖХ (объем колонки 1-5 мл)
- полумикро-ВЭЖХ (объем колонки 0.1-1 мл)
- микро-ВЭЖХ (объем колонки 0.01-0.1 мл)
- одноканальное детектирование
- многоканальное детектирование

- короткие колонки (длина 50-100 мм)
- "обычные" колонки (длина 100-250 мм)
- длинные колонки (длина 250-1000 мм)

- скоростная ВЭЖХ (10 пиков/мин)
- "обычная" ВЭЖХ (1 пик/мин)

- стационарный
- транспортабельный

- ручной
- автоматический

- набор блоков
- моноблок

- самописец
- электронный интегратор
- персональный компьютер

- "грубый" (погрешность анализа 5-10%)
- "нормальный" (погрешность анализа 2-5%)
- "прецизионный" (погрешность анализа 0.5-2%)

- пульт управления
- компьютерное управление

- изократическое элюирование
- двухкомпонентный градиент
- многокомпонентный градиент

- без термостата колонок
- твердотельный термостат
- воздушный термостат

МИЛИХРОМ А-02

Покупатель: Огромное спасибо за консультацию. Она была чрезвычайно интересной и полезной. До свидания.

*Лимнологический институт
Сибирского отделения РАН, г. Иркутск*

Получено 25.05.2004