



### Agilent Technologies

Authorized Distributor



# Дебаты о UHPLC закончены! UHPLC = Agilent 1290 Infinity

Новая модель жидкостного хроматографа Agilent 1290 INFINITY LC открывает следующий уровень производительности, скорости разделения, чувствительности для выполнения методик как в области HPLC, так и UHPLC, RRLC.

Agilent 1290 INFINITY LC – первая система, которая позволяет работать с колонками HPLC или UHPLC любых производителей в широком диапазоне значений внутреннего диаметра и длины, а также дисперсности сорбентов. 1290 INFINITY – «бесконечность» – открывает действительно бесконечные возможности для решения сложных аналитических задач в LC и LC/MS. Диапазон мощности 1290 INFINITY сочетает в себе сверхвысокое давление – до 1200 бар, а также скорость потока – до 5 мл/мин, что обеспечивает наивысшую производительность ЖХ-системы

## 1. Этапы совершенствования жидкостных хроматографов

Развитие жидкостной адсорбционной хроматографии всегда было направлено на повышение эффективности хроматографического разделения. Одной из очевидных мер на этом пути является увеличение дисперсности сорбентов. В свое время эта тенденция привела к необходимости изменения аппаратного оформления, обусловленного невозможностью движения элюентов самотеком, под действием только силы тяжести, в колонках с сорбентами диаметром частиц менее 20–25 микрон. А

для колонок с дисперсностью сорбентов менее 10 микрон потребовалось создание новых приборов – жидкостных хроматографов, которые способны были подавать элюенты под давлением нескольких десятков и даже несколько сотен атмосфер. С развитием производства жидкостных хроматографов у разных изготовителей величина рабочего давления подошла к пределу 400 атм, что было более чем достаточно для работы с сорбентами 10, 5,0 и даже 3,5 мкм.

Условия хроматографирования на таких колонках в корне отличались от условий классической хроматографии на сухих сорбентах, которые использовались, как правило, только для одного разделения. Необходимость многократного использования одной и той же колонки привело к созданию многих тысяч типов поверхностно-привитых сорбентов. Появление хроматографов, новых колонок с мелкодисперсными модифицированными сорбентами многократного использования привели в конце 70-х – начале 80-х годов прошлого века к рождению новой области в жидкостной хроматографии – высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ или HPLC – High Performance Liquid Chromatography).

К началу нового тысячелетия метод HPLC превратился в обязательный для многих видов лабораторий. За более чем три десятилетия были разработаны тысячи методик для колонок с сорбентами в 3–5 микрон. Дальнейшее уменьшение размеров зерна сорбентов оставалось заманчивой перспективой не только на пути повышения эффективности колонок, но и еще по одной причине. С уменьшением размера зерна сорбентов до суб-двухмикронных значений (STM, Sub-Two-Micron) кривая, которая характеризует зависимость эффективности работы колонки от скорости потока, становится параллельной оси абсцисс (рис. 1). То есть, увеличение скорости потока в таких колонках не оказывает заметного влияния на эффективность разделения. Считается, что именно это обстоятельство отличает хроматографию на STM-сорбентах от «классических» вариантов HPLC.

Однако, внедрению суб-двухмикронных сорбентов препятствовал значительный рост гидродинамического сопротивления колонок, а также ограничение предельных значений рабочего давления хроматографов.

На пути преодоления этих препятствий в 2003 году фирма Agilent Technologies первая освоила серийный выпуск колонок с сорбентами дисперсностью 1,8 мкм. Усилия были направлены на повышение проницаемости колонок путем удаления пылевой (<1,0) фракции сорбентов и незначительной (~4%) добавки фракции 2,5 мкм.

В результате на хроматографическом рынке появились колонки с STM-сорбентами, обладающие не только гораздо более высокой эффективностью, но и позволяющие работать на хроматографах с предельным рабочим давлением до 400 атм. Следует однако отметить, что такие сорбенты можно было использовать только в относительно коротких (<50 мм) колонках. Но уже это позволило реализовать методики, разработанные ранее для длинных (150–250 мм) колонок, без потери эффективности разделения, но при существенно более коротком времени анализа. К сожалению, использование на «классических» хроматографах длинных (>50–70 мм) колонок с STM-сорбентами было проблематичным из-за ограничения по давлению в 400 атм, что не позволяло получить требуемые скорости потоков.

Поэтому, начиная с 2004 года, все ведущие производители жидкостных хроматографов, включая Agilent Technologies, последовательно начали выпуск хроматографических систем с граничными значениями рабочих давлений 600 атм и выше.

## 2. Дебаты по поводу UHPLC

Очевидно, что переход к работе на STM-сорбентах не носит принципиального характера, такого, как например, переход от ЖХ к ВЭЖХ. Взаимодействие сольватированных веществ с поверхностью сорбентов на молекулярном уровне осталось неизменным. Названия неподвижных фаз остались теми же. Не изменился и характер

взаимодействия подвижная-неподвижная фаза. Остался прежним порядок выполнения методик: сорбент в начале разделения находится в равновесии с неподвижной фазой, процесс разделения происходит в градиентном режиме от слабого элюента на старте – до сильного в конце разделения. Поэтому эту новую область жидкостной хроматографии на STM-сорбентах можно смело считать одним из видов ВЭЖХ (HPLC).

Однако, массированные рекламные компании фирм-изготовителей жидкостных хроматографов дали жизнь целой группе «ультра-терминов: UPLC (Ultra Performance LC), RRLC (Rapid Resolution LC), UFLC (Ultra-Fast LC) и других. Наиболее часто встречается общий термин UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography), ко-

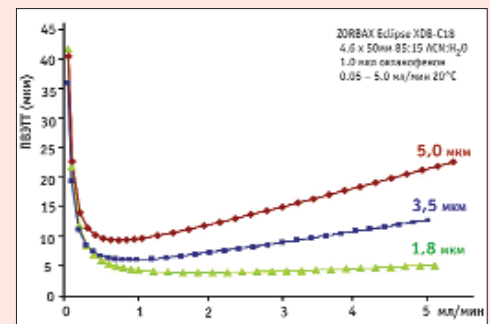


Рис. 1. Кривые Ван-Деемтера (зависимость приведенной высоты теоретической тарелки – ПВЭТТ от линейной скорости элюента) для колонок с сорбентами 5,0; 3,5 и 1,8 мкм

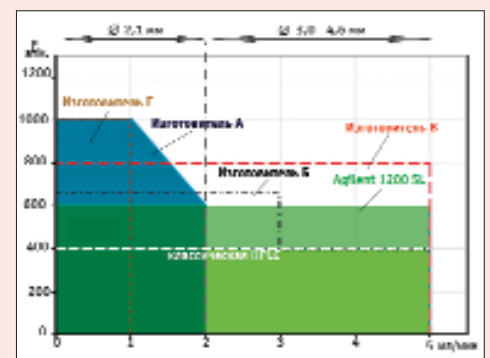


Рис. 2. Графики значений давлений и скоростей потоков, характерных для UHPLC-хроматографов некоторых изготовителей до 2009 г.

торый и будет использован в данной публикации. Появление новых терминов, различных по написанию, но одинаковых по своей сути, породило **многочисленные дебаты** о том, что следует считать UHPLC, а что – нет. Так или иначе, но выпуск новых UHPLC-хроматографических систем и использование STM-сорбентов открыли путь к переходу к скоростным разделениям, **существенному уменьшению времени анализов**.

К началу выпуска нового хроматографа Agilent 1290 Infinity изготовители аналитического оборудования предлагали жидкостные хроматографы для UHPLC, которые имели самые разные значения скоростей потоков и верхних пределов давлений (рис. 2).

Существенная часть дебатов была посвящена преимуществам и/или недостаткам выпускаемых

хроматографов. Некоторые изготовители приборов широко рекламировали существенное увеличение рабочего давления (до 1000 атм), другие, ссылаясь на кривые Ван-Деемтера (рис. 1), настаивали на том, что именно обеспечение высоких скоростей потоков (до 5 мл/мин.) является правильным путем к UHPLC. Предметами обсуждений были также и дисперсность сорбентов (3,5 или 1,8 мкм?), их структура (поверхностно-пористые или пористые?), диаметр колонок (2,1 или 4,6 мм?).

### 3. Основные параметры хроматографических систем

Очевидный путь к сокращению времени анализов лежит в совершенствовании хроматографических колонок. Более эффективные высокодисперсные STM-сорбенты дали возможность сократить длину колонок без потери разрешения. Другой тенденцией является стремление работать с колонками меньшего диаметра, что ведет к сокращению расхода элюентов и может способствовать повышению чувствительности анализа. Однако, следует помнить, что сокращение размеров колонок приводит к уменьшению их внутреннего объема ( $V_1$ ), который приближается к **внутреннему объему хроматографической системы** ( $V_2$ ). Работа в градиентных режимах для таких хроматографических систем становится все более затруднительной. По мере того как  $V_1$  приближается к  $V_2$ , все усилия, достигнутые за счет уменьшения размеров колонок, направленные на сокращение времени анализа, оказываются тщетными, поскольку время, требуемое для промывания объема  $V_2$ , оказывается лимитирующим фактором. Кроме того, метрологические характеристики прибора также ухудшаются.

Уменьшение  $V_1$  приводит к обострению и другой проблемы. Чтобы обеспечить нормальные условия хроматографического разделения для колонок с малыми зна-

Рис. 3. Новый универсальный HPLC + UHPLC жидкостный хроматограф Agilent 1290 Infinity.

$P$  – до 1200 атм,  
 $V$  – до 5 мл/мин. (800 атм)

чениями  $V_1$ , необходимо уменьшать объем вводимой пробы ( $V_3$ ). Если размеры и **объем проточной кюветы** ( $V_4$ ) в системе остаются неизменными, уменьшение  $V_1$  и  $V_3$  влечет за собой потерю чувствительности всей хроматографической системы.

Общее сокращение времени анализа при скоростных разделениях сопровождается уменьшением объема элюирования каждого хроматографического пика. Пики становятся более интенсивными по амплитуде и более узкими по времени. Третьей проблемой на пути реализации скоростных анализов является недостаточная **скорость сбора данных** классических ВЭЖХ-детекторов и, как следствие, – потеря хроматографического разрешения.

Еще одним препятствием на пути реализации скоростных анализов является обеспечение достаточно высокой **скорости потоков** элюентов при больших значениях рабочего давления. С увеличением давления сжимаемость жидкости оказывает все большее влияние на точность работы насосов.

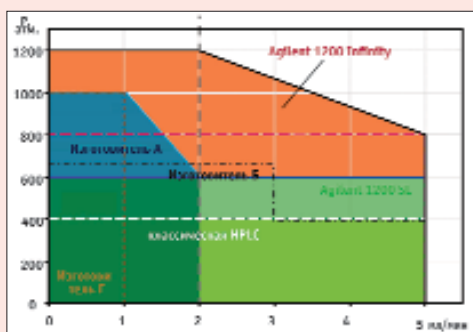


Рис. 4. Диаграмма давлений и скоростей потоков, характерных для UHPLC-хроматографов некоторых изготовителей, в сравнении с параметрами Agilent 1290 Infinity



Рис. 5. Насосная система двухканального градиентного насоса Agilent 1200 Infinity. Работой каждого плунжера управляет свой микропроцессор

Увеличение хода поршня плунжерных насосов для обеспечения больших скоростей потоков приводит к росту пульсаций потока и в результате – к повышению уровня шума чувствительных детекторов. Увеличение частоты работы поршневой насоса ведет к сокращению срока службы уплотнений и к проблеме перегрева плунжеров. Поэтому реализация больших скоростей потоков с минимальными пульсациями и одновременно с большими значениями давлений представляло очень существенную проблему.

Итак, стремление к повышению скорости анализов поставило перед конструкторами **целый ряд технических проблем**, главными из которых были: 1) большой внутренний объем хроматографической системы; 2) конструкция проточной кюветы, которая обеспечивала бы требуемую чувствительность анализа; 3) недостаточная частота сбора данных спектрофотометрических детекторов – наиболее часто применяемых детекторов в ВЭЖХ; 4) необходимость увеличения рабочего давления системы до значений более чем 400 атм при поддержании больших потоков элюентов. Решение этих и других проблем привело к необходимости существенной переделки практически всех ключевых узлов хроматографа.

Каждый из мировых производителей аналитического оборудования по-разному подошел к решению задач проектирования новых UHPLC-систем. К маю 2009 года пользователям предлагалось около **10 разных жидкостных хроматографов** с рабочим давлением 600 атм и более, в которых перечисленные выше проблемы в той или иной степени преодолены. Таким образом, на рынке оборудования предлагались хроматографы, имеющие совершенно **разные параметры** рабочих давлений, скоростей потоков, **разные значения** внутренних объемов ( $V_2$ ).

Так или иначе, но все эти разные модели и марки хроматографов породили **проблему совместимости приборов**, методик и колонок. Разные значения  $V_2$  хроматографических систем, предельные рабочие давления и ско-

рости потоков сделали затруднительным, а во многих случаях и невозможным, перенос методик, разработанных на хроматографе одной марки, на приборы других изготовителей.

### 3.1. Основные параметры нового UHPLC хроматографа Agilent 1290 Infinity

С мая 2009 года Agilent Technologies начал серийный выпуск новой модели жидкостных хроматографов (рис. 3), которая по своим параметрам далеко опережает все приборы UHPLC, имеющиеся на рынке. Если представить мощность насоса как произведение скорости потока на рабочее давление и посмотреть на диаграмму, приведенную на рис. 4, становится ясным, что **двухканальный насос Agilent 1290 Infinity по мощности** не имеет себе равных. С его помощью можно воспроизвести любые методики из когда-либо разработанных как в «классической» зоне HPLC (400 атм – 5 мл/мин.), так и UHPLC.

Превосходя скоростную модель Agilent 1200 SL в два раза по значению рабочего давления (**до 1200 атм**) в диапазоне до 2 мл/мин, новый хроматограф при 800 атм способен поддерживать скорость потока 5 мл/мин.

**Внутренний объем** хроматографической системы Infinity составляет всего 10 мкл, что в несколько раз ниже этого значения для любых других хроматографов.

## 4. Особенности конструкции Agilent 1290 Infinity

### 4.1. Насосная система

Стремление существенно повысить давление при сохранении высоких скоростей потоков потребовало принципиально новых конструкций решений в насосной системе. Совместно с разработчиками автомобильных насосов высокого давления, применяемых в дорогих моделях джипов Porsche Cayenne, специалисты Agilent существенно доработали конструкцию насосной системы хроматографа. Для обеспечения эффективного отвода тепла от плунжеров **двухканального насоса**, они изготавливаются из спеченного карборунда (SiC), обладающего наряду с высокой твердостью еще и хорошей теплопроводностью.

Однако, основное преимущество насосной системы – способность обеспечивать большие скорости потоков при высоких значениях давлений – в жидкостных хроматографах само по себе имеет невысокую ценность. Не менее важной является способность системы поддерживать потоки элюентов с минимальным уровнем пульсаций, которые вносят основной вклад в шум нулевой линии на хроматограммах.

Каждый из четырех плунжеров, составляющих насосную систему Agilent 1290 Infinity (рис. 5), работает под управлением своего индивидуального микропроцессора.

Это дало возможность создать уникальную систему **активного**

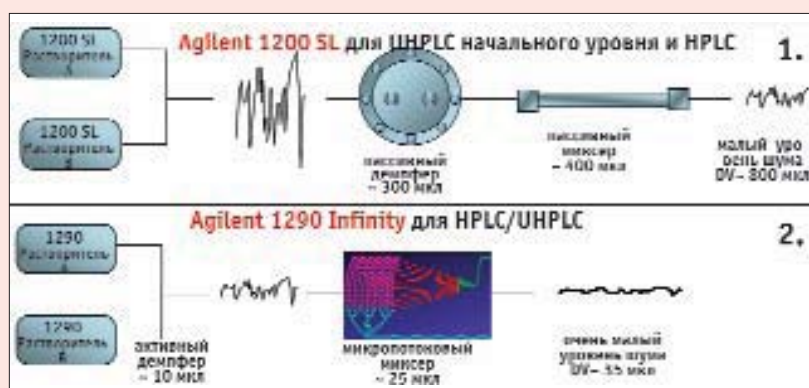


Рис. 6. Сравнение классической схемы демпфирования пульсаций давления (Agilent 1200 SL – 1) с системой демпфирования Agilent 1290 Infinity – 2 и ее влияние на сигнал УФ-детектора в сочетании со значениями мертвого объема хроматографической системы (DV)

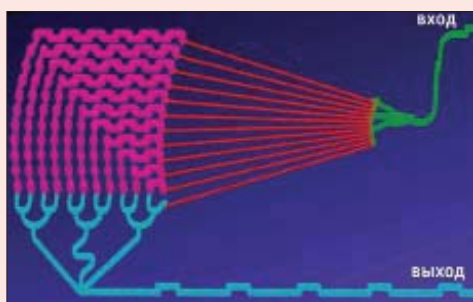


Рис. 7. Схема микропоточкового миксера Jet Weaver объемом 25 мкл

демпфирования пульсаций потока без дополнительных демпферов. Активное демпфирование позволило снизить уровень пульсаций потока до уровня сравнимого с тем, который демонстрирует модель Agilent 1200 SL в конфигурации с пассивным демпфером и миксером (рис. 6).

Индивидуальное микропроцессорное управление каждым из четырех плунжеров высокого давления сделало возможным сохранение **стабильной** скорости подачи элюента даже при появлении незначительных **течей**, не прерывая проведения серии анализов.

Сглаживание пульсаций потока составляет только одну часть проблемы снижения шума СФ-де-

текторов. Дополнительный вклад в шум детекторов вносят флуктуации состава элюента, которые неизбежно появляются при работе в градиентных режимах.

Добавление к насосной системе микропоточкового многоуровневого миксера Jet Weaver минимизирует флуктуации состава элюента, что, в свою очередь, проявляется в виде малых **шумов** УФ-детекторов (рис. 6). Работа этого уникального и необычайно эффективного миксера основана на разветвлении потока на множество каналов, вытравленных в пластине из нержавеющей стали, с последующим воссоединением этих каналов в единый поток (рис. 7). Миксер увеличивает мертвый объем хроматографической системы всего на 25 мкл.

Таким образом, активное демпфирование, эффективный миксер, минимальный внутренний объем в сочетании с высокой мощностью насосной системы обеспечивают **необходимое условие** для постановки практически любых методик в самой широкой области давлений и скоростей потоков UHPLC.

Обладая самым малым внутренним объемом из всех когда-либо выпускавшихся хроматографов, Agilent 1290 Infinity позволяет решать еще одну важную задачу. Пользователям

предлагаются наборы устройств, которые можно монтировать в гидравлическую систему и **увеличивать** внутренний **мертвый объем**, подстраивая этот параметр под другие модели жидкостных хроматографов от Agilent Technologies или любого другого изготовителя.

Таким образом, Agilent 1290 Infinity решает **проблему воспроизведения методик**, разработанных ранее на любых других жидкостных хроматографах.

## 4.2. Системы ввода проб. Автосамплер 1290 Infinity

Скоростной автосамплер 1290 Infinity представляет новое поколение устройств для автоматического ввода проб под давлением до 1200 атм. Он позволяет производить набор и ввод пробы объемом от 0,1 до 40 мкл с высокой точностью без необходимости смены петли и потери даже минимальной порции образца. Проба набирается в петлю при помощи дозирующего устройства (рис. 8). Затем игла опускается в седло, и кран-переключатель направляет поток через петлю в колонку.

Конструкция автосамплера предусматривает возможность промывания иглы как путем ее погружения во флакон с растворителем, так и внутри специального промывочного порта с помощью перистальтического насоса. Инертные материалы, из которых изготовлена игла, капилляры и дозирующее устройство, практически исключают перенос проб. Декларируется пренебрежительно малое значение переноса пробы по хлоргексидину (<0.002%).

Автосамплер позволяет вводить пробы как из флаконов на 2 мл, так и из двух планшетов на 96 и 384 лунки. Внешний термостат обеспечивает хранение термочувствительных проб при температурах от + 4°C до +40°C.

Как и другие модели автосамплеров от Agilent Technologies, 1290 Infinity дает возможность существенно сократить цикл работы за счет **перекрытия операций** подготовки последующей пробы и проведения анализа предыдущей. Тем самым удается

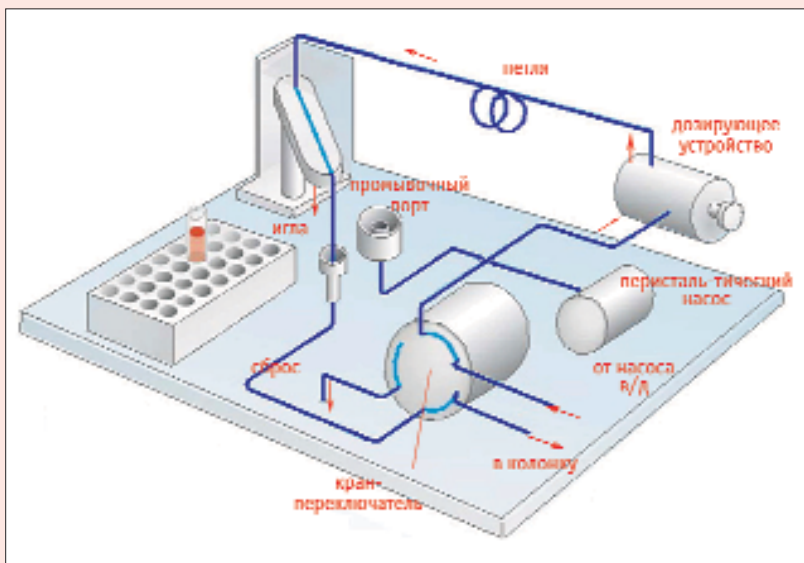


Рис. 8. Схема работы автосамплера 1290 Infinity в режиме ввода пробы. В режиме промывки игла переводится в промывочный порт

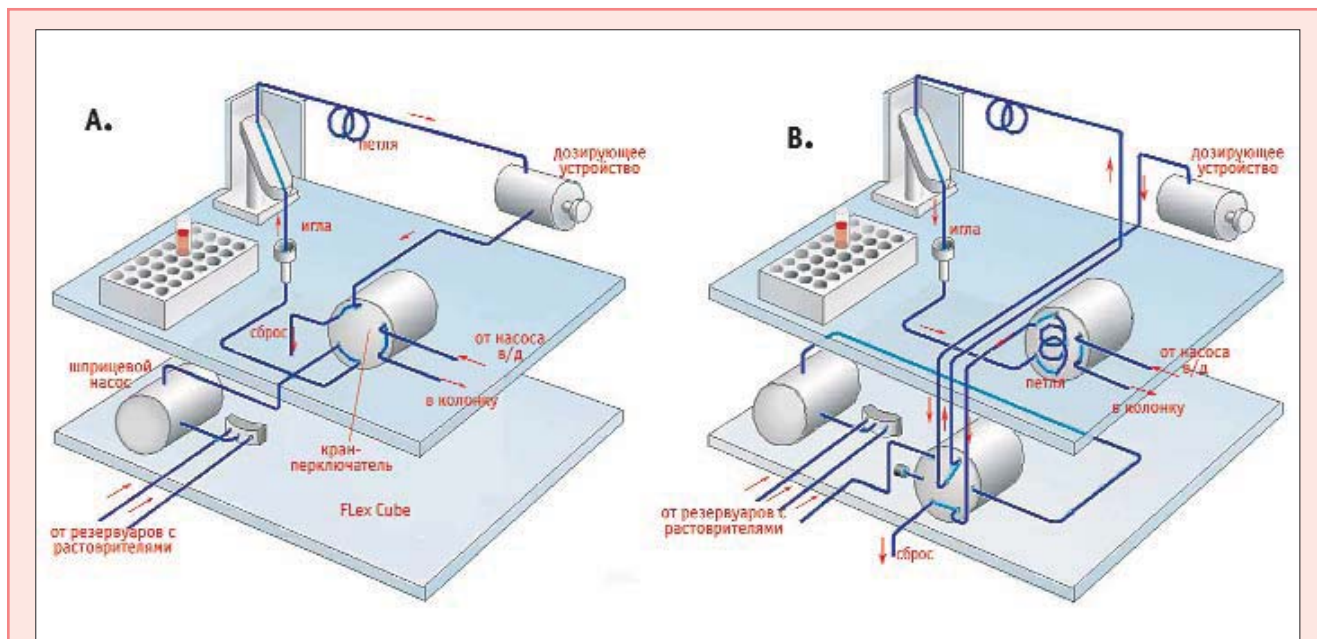


Рис. 9. Совместная работа автосамплера 1290 Infinity с дополнительным устройством Flex Cube.

А. Схема для работы с переменным объемом пробы (0,1–40 мкл). Положение для промывки иглы (доп. мертвый объем 70 мкл).

В. Схема для работы с фиксированной петлей. Положение для ввода пробы в петлю (доп. мертвый объем 20 мкл)

сократить время между пробами до нескольких десятков секунд, что существенно повышает общую производительность хроматографа при выполнении массовых скоростных анализов.

#### 4.2.1. Автосамплер + Flex Cube 1290 Infinity

В качестве дополнительного устройства автосамплер может комплектоваться приставкой Flex Cube, которая расширяет его возможности. В состав приставки входят шприцевой насос и дополнительные краны-переключатели потоков как на линиях высокого, так и низкого давлений. Flex Cube может быть соединен с автосамплером так, как показано на рис. 9а. При такой коммутации автосамплер осуществляет ввод пробы переменного объема (0,1–40 мкл) таким же образом, как и без приставки. А шприцевой насос высокого давления приставки Flex Cube используется для обратной промывки седла иглы, что еще больше уменьшает перенос проб и предотвращает блокировку седла. При всех достоинствах такой схемы введения пробы (рис. 8 и 9а), автосам-

плер имеет внутренний мертвый объем 70 мкл.

Этот недостаток может быть устранен при альтернативной коммутации всех элементов гидравлической схемы (рис. 9в), когда ввод пробы осуществляется из петли фиксированного объема. В этом случае внутренний мертвый объем автосамплера составляет всего 10 мкл.

Следует помнить, что работа автосамплера в обычном режиме (рис. 8 и 9а) покрывает подавляющее большинство применений. Конфигурация с фиксированной петлей предназначена, в основном, для скоростных и ультра-скоростных разделений. При этом предполагается, что сама проба не представляет ценности, поэтому промывание петли, как минимум пятикратным объемом пробы, не является критичным при проведении таких анализов.

#### 5. Минимальный внутренний объем хроматографической системы

Таким образом, хроматографическая система 1290 Infinity может быть сконфигурирована в следующих вариантах:

1) насос (10 мкл) + фиксированная петля объемом 5 мкл (10 мкл) = 20 мкл.

2) насос (10 мкл) + Jet Weaver (25 мкл) + фиксированная петля объемом 5 мкл (10 мкл) = 55 мкл.

3) насос (10 мкл) + петля переменного объема (70 мкл) = 80 мкл.

4) насос (10 мкл) + Jet Weaver (25 мкл) + петля переменного объема (70 мкл) = 110 мкл.

Такие значения мертвых объемов делают Agilent 1290 Infinity совершенно уникальной хроматографической системой. ■

Продолжение  
в следующем номере

#### Контактная информация:

ООО «АЛСИ-ХРОМ»

Киев, 01042

ул. Ивана Кудри,

22/1, офис 70

Телефоны/факс:

+380 (044) 521-61-47;

+380 (044) 521-67-30;

+380 (044) 521-67-33

e-mail: lab@alsichrom.com

www.alsichrom.com

