

Дебаты о UHPLC закончены!

UHPLC = Agilent 1290 Infinity



Agilent Technologies
Authorized Distributor

Окончание, начало в №2 (19).

6. Термостат колонок 1290 Infinity

Новый термостат колонок 1290 Infinity предназначен для поддержания температур в диапазоне от 10°C ниже комнатной до 100°C с точностью $\pm 0,05^\circ\text{C}$. Его функция состоит в быстром изменении температуры элюента от комнатной до заданной с последующим возвратом ее значения обратно до комнатной. Такое снижение температуры элюента после выхода из колонки оказывает существенное влияние на уменьшение уровня шума спектрофотометрических детекторов и особенно сильно влияет на стабильность работы рефрактометрического детектора. Эффективность такого подхода к стабилизации температуры элюента была впервые апробирована на предыдущей модели скоростного хроматографа Agilent 1200 SL.

Термостат состоит из отсека, позволяющего вмещать до трех аналитических колонок длиной до 300 мм или несколько колонок меньшей длины, двух теплообменников (элементы Пельтье), соединительных капилляров, а также крана-переключателя потоков (рис. 10). Кроме того, имеется датчик течей и дренажное устройство для сбора жидкости в случае протекания элюента.

Сменная головка крана-переключателя позволяет изменять конфигурацию хроматографа и коммутацию колонок. Легкое нажатие на кран вызывает его выдвижение вперед целиком, после чего операции по замене головки не составляют труда. Выбор из 6-, 8- и 10-портовых головок делает возможным постановку любой аналитической задачи, связанной с переключением потоков элюента. Каждый тип головки снабжен радиочастотным датчиком, который распознается программным обеспечением. В ПО заложены значения предельных давлений,

на которые рассчитан каждый кран. Кроме этого программа ведет учет количества переключений крана.

6.1. Конфигурация высокопроизводительного хроматографа

Один из самых простых примеров использования крана-переключателя приведен на рис. 11. Колонка №1 и колонка №2 идентичны. Вспомогательный насос высокого давления подает в систему слабый элюент, состав которого соответствует началу хроматографическо-



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

го разделения (на рис. 11 выделен зеленым цветом). Он осуществляет промывание колонки №2, в то время как основной насос 1290 Infinity реализует режим градиентного элюирования из колонки №1. По окончании анализа колонка №1 оказывается в равновесии с сильным элюентом. В этот момент кран переключается и следующий анализ выполняется на колонке №2, которая к этому времени уже пришла в состояние равновесия со слабым элюентом, а вспомогательный насос приступает к подготовке колонки №1.

Такая конфигурация применяется для повышения производительности хроматографа за счет экономии времени, затрачиваемого на регенерацию аналитической колонки после градиентного элюирования. Положительный эффект тем существеннее, чем меньше время, затрачиваемое непосредственно на хроматографическое разделение.

Так, при проведении массовых анализов по контролю качества вновь синтезируемых веществ (чистота по данным ЖХ/МС), время отдельного анализа составляет несколько десятков секунд, что сопоставимо со временем, необходимым для регенерации колонки. Для таких (НТ – High Throughput) анализов экономия времени может составлять до 50%. В результате общее количество анализов, выполняемых на хроматографической системе Agilent 1290 Infinity с альтернативной регенерацией колонок, может достигать до 2000 в сутки.

6.2. Хроматограф для разработки и оптимизации методик

В процессе разработки методик химику-аналитику требуется проводить множество непроизводительных операций, связанных со сменой состава элюента, подбором хроматографической колонки оптимальной по размерам и природе сорбента. Кроме того, все эти действия, выполняемые вручную, влекут за собой большой риск совершения ошибки, которую не всегда просто обнаружить.

Agilent Technologies предлагает множество вариантов жидкостных хроматографов, специально предназначенных для разработки мето-



Рис. 10. Термостат колонок 1200 Infinity со снятой наружной крышкой. Отмечены некоторые из элементов, конструкция которых претерпела изменения

дик. Полностью совместимые модули хроматографов Agilent 1200 SL и 1290 Infinity предоставляют возможность собрать хроматограф, который отвечает потребностям и бюджету конкретной лаборатории. В конфигурацию хроматографа может входить два (рис. 12), или даже три термостата (6 независимо контролируемых температурных зон), в которых можно расположить и соединить через краны-переключатели до 8 разных по размерам и типам сорбентов колонок. Дополнительные краны-переключатели потоков растворителей дают возможность соединить выбранную колонку с любыми двумя из 26 резервуаров с элюентами, различными по своему составу.

Работа по разработке или оптимизации методики на таком приборе может осуществляться в «по-

луавтоматическом» режиме. В этом случае аналитик использует все возможности ПО ChemStation™ для программирования всех операций по переключению кранов и выбору колонок в соответствии со своими представлениями о пути оптимизации той или иной методики. Следует отметить, что такие работы очень трудоемки и не гарантируют нахождения действительно оптимальных параметров той или иной методики, поскольку в процессе работы следует изменять сразу несколько параметров: pH, t°, состав и ионную силу буферов, форму градиента и пр.

Применение дополнительных программ ChemSword™ или ACD/Autochrom™, специально предназначенных для разработки и оптимизации методик, позволяет не только проводить эти работы

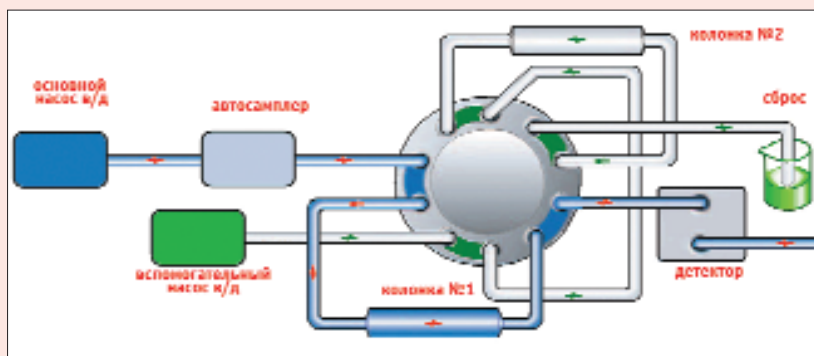


Рис. 11. Схема подключения двух одинаковых колонок и дополнительного насоса для промывания колонки №2 во время проведения анализа на колонке №1. После завершения анализа, кран переключается и анализ проводится на колонке №2, а в это время колонка №1 промывается элюентом исходного состава



Рис. 12. Конфигурация Agilent 1290 Infinity с двухканальным насосом, двумя термостатами колонок, двумя дополнительными внешними кранами-переключателями потоков и масс-детектором Agilent 6130

в полностью автоматическом режиме, но и документировать весь процесс в соответствии с правилами организации работ в лабораториях (GLP).

6.3. Другие варианты использования кранов

Применение кранов-переключателей колонок в хроматографах Agilent 1200 SL и 1290 Infinity открывает возможности для реализации самых разнообразных методик. Это и возможность проведения подготовки проб путем концентрирования аналитов на одной колонке с последующим их вводом в другую (анализ различных вод), и проведении двумерной или многомерной хроматографии. Список применений с использованием кранов постоянно расширяется.

7. Новый диодно-матричный детектор 1290 Infinity

В диодно-матричный детектор 1290 Infinity внесено много новых конструктивных изменений, даже по сравнению с DAD 1200 SL, выпуск которого отмечен был совсем недавно. Так, практически полностью изменена оптическая схема, а также применена уникальная конструкция проточной кюветы (Max Light), помещенной в картридж. Практически весь свет от дейтериевой лампы фокусируется оптиче-

ской системой на чрезвычайно малой площади торца световода, который также расположен в картридже. Яркий свет практически без потерь проходит по входному световоду, затем – через проточную кювету и далее – по второму световоду выходит из картриджа. Затем оптическая система направляет свет через щель с программируемой шириной на дифракционную решетку и, после разложения, спектр регистрируется на линейке из 1024 светодов (рис. 13).

Конструкция Max Light обеспечивает прохождение гораздо большего количества света через кювету, по сравнению с предыду-

щими моделями детекторов, что позволило снизить предел обнаружения методик от 2 до 20 раз(!) для кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Для кюветы 60 мм **выигрыш по чувствительности составляет от 8 до 80 раз!** Кроме очевидных преимуществ, которые открывает возможность использования высокочувствительного детектора, 1290 Infinity позволяет вводить гораздо меньшие количества проб при сохранении пределов обнаружения в колонки меньших размеров. Таким образом, открылась возможность адаптировать HPLC методики для условий UHPLC без ухудшения хроматографического разрешения, но за существенно меньшее время.

Время анализов на 1290 Infinity может быть сокращено в десятки раз по сравнению с традиционными HPLC методиками. Однако, общее сокращение времени анализа сопряжено с резким уменьшением ширины пиков на хроматограммах (рис. 14). Для правильного описания формы таких узких хроматографических пиков частота регистрации спектров повышена до **160 Гц**.

Каждый тип кюветы и лампа снабжены радиочастотной меткой, которая распознается хроматографической системой, поэтому исключается возможность ошибки, связанной с использованием кюветы другого номинала, или лампы, срок службы которой истек. Информация об используемом элементе системы может быть включена в отчет о проведении анализа.



Рис. 13. Проточная кювета и оптическая схема диодно-матричного детектора Agilent 1290 Infinity (160 Гц). Программируемая ширина оптической щели (1–8 нм)

8. 1290 Infinity – наилучший выбор для ЖХ/МС

Уникальные параметры 1290 Infinity делают его самым лучшим хроматографом для сочетания с любым типом из масс-спектрометров, выпускаемых Agilent Technologies. Благодаря непревзойденной мощности он способен обеспечивать как самые большие скорости элюирования, так и самое высокое хроматографическое разрешение. Наименьший внутренний объем системы (20 мкл) из всех выпускаемых хроматографов делает возможным реализацию самых крутых градиентов, что также способствует постановке самых быстрых методик. Минимальный перенос пробы (<0,002%) исключает ошибки, которые могут возникнуть за счет загрязнения последующей пробы остатками предыдущей. Сочетание этих уникальных параметров жидкостного хроматографа с системой Jet-Stream, многократно улучшающей условия ионизации в масс-детекторах, обеспечивает наилучшие показатели по чувствительности (< 1 фг) любой из выпускаемых ЖХ/МС систем.

Высокое быстродействие квадрупольных (режимы SIM и MRM) и особенно времяпролетных (TOF) масс-спектрометров идеально подходит к возможностям нового высокопроизводительного хроматографа 1290 Infinity. Большая скорость сканирования TOF позволяет осуществлять быстрый скрининг неизвестных соединений (рис. 15) в процессе записи хроматограммы. А использование масс-детекторов с тройным квадруполем (QQQ в режимах MRM) дает возможность проводить точное описание всех хроматографических пиков в сочетании с высочайшей чувствительностью для количественного анализа целевых соединений. Данные о некоторых возможностях этих ЖХ/МС приведены в Табл. 1.

Диапазон применений аналитических комплексов ЖХ/МС, где в полной мере используются все достоинства 1290 Infinity, самый широкий:

- скоростные (<1 мин) серийные массовые анализы. Контроль качества новых соединений на

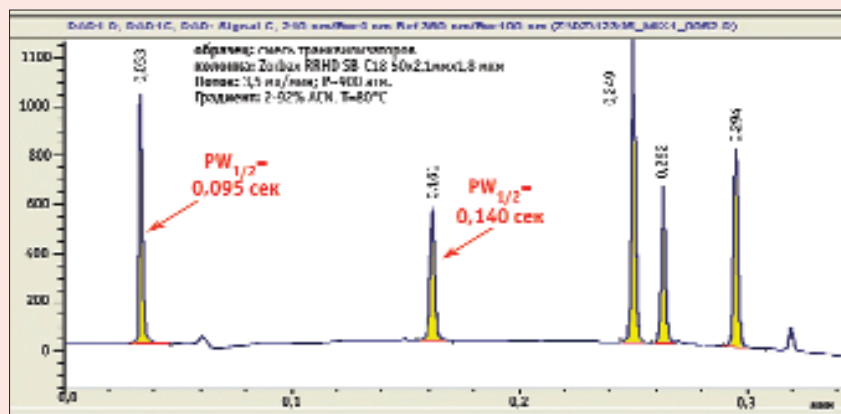


Рис. 14. Пример ультра-скоростного разделения образца смеси транквилизаторов. Цветом выделены значения ширины хроматографических пиков на половине высоты (PW_{1/2})

- коротких колонках (одноквадрупольный масс-детектор SQ);
- идентификация (скрининг) неизвестных соединений (TOF, Q-TOF) в сложных смесях (пищевые продукты, токсикологические исследования, объекты окружающей среды, метаболиты лекарственных препаратов или природных соединений и пр.);
- протеомные исследования на коротких и длинных (от 15 до 250 мм) колонках – в комбинации с ионными ловушками (IT), тандемными масс-спектрометрами Q-TOF;
- исследования путей миграции известных метаболитов in vivo и количественный экспресс-анализ следовых количеств соединений, содержание которых

регулируется нормативными актами (QQQ). Пищевые продукты, физиологические жидкости, анализ воды и почвы, метаболиты лекарственных препаратов или природных соединений и пр.

9. Колонки для (U)HPLC от Agilent Technologies

Название хроматографа 1290 «Infinity» означает «бесконечность». Этим именем создатели хроматографа стремились подчеркнуть возможность работать с любыми колонками HPLC или UHPLC с основными параметрами в широком диапазоне значений: внутренний диаметр (1–4,6 мм), длина (15–300 мм), дисперсность сорбентов (>2,0; 2,7; 3,5 или

Табл. 1. Сравнительные данные по результатам идентификации смеси из 224 пестицидов, проведенные с помощью времяпролетного (TOF) и масс-детектора с тройным квадруполем (QQQ) методом ЖХ/МС. Скрининг неизвестных (TOF) и целевых (QQQ) соединений

1290/6230 TOF результаты скриннга смеси неизвестных 224 пестицидов			1290/6460 QQQ результаты идентификации целевых 224 пестицидов	
Количество аналита на колонку	Количество идентифицированных соединений (%)	Средняя точность измерения массы, ppm	Количество аналита на колонку	Количество идентифицированных соединений (%)
500 фг	45 (20%)	0,24	50 фг	84 (37%)
1,25 пг	96 (43%)	0,51	100 фг	196 (87%)
2,5 пг	124 (55%)	0,49	500 фг	215 (96%)
5,0 пг	163 (73%)	0,12	1,0 пг	222 (98)
25 пг	202 (90%)	0,70	5,0 пг	223 (99%)
50 пг	217 (97%)	0,06	10 пг	224 (100%)
125 пг	224 (100%)	0,6	25 пг	224 (100%)

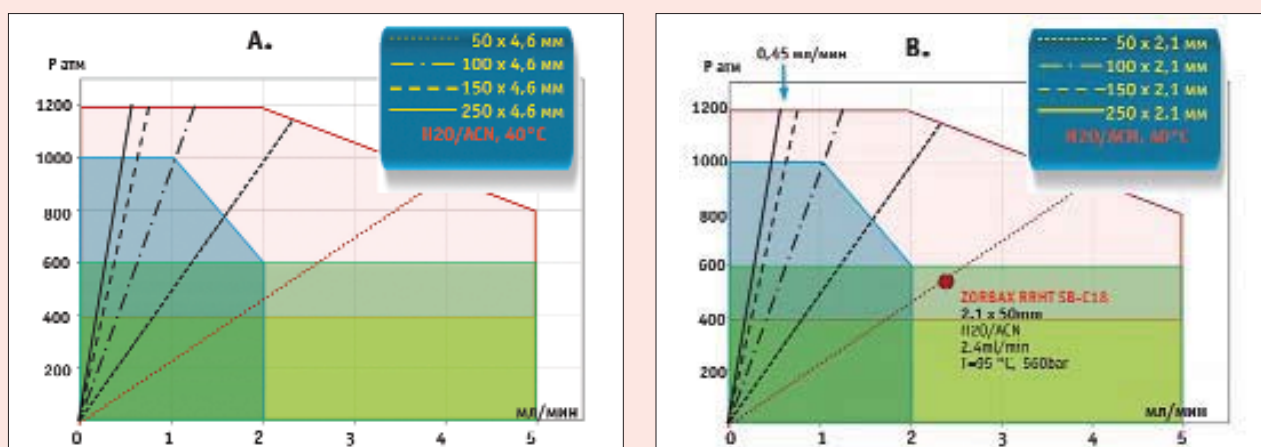


Рис. 15. Диаграммы зависимости значений давления (P) от скорости потока (V) для колонок разной длины и внутреннего диаметра (4,6 мм – А. 2,1 мм – В.) с STM-сорбентом. Для сравнения приведен график P/V для колонки Zorbax RRHT 1,8 мкм при повышенной температуре

5,0 мкм) и от любых производителей. Единственным ограничением для работы с той или иной колонкой являются значения их предельных рабочих давлений.

Высокая мощность насосной системы 1290 Infinity позволяет работать с колонками, наполненными сорбентами диаметром зерна менее 2 мкм, в самом широком диапазоне скоростей потоков и давлений (рис. 15). Анализ диаграммы на рис. 15 показывает, что новый хроматограф перекрывает области работы любого другого хроматографа, а также обеспечивает хроматографические разделения в обширной области, в которой может работать только 1290 Infinity (выделена розовым цветом выше 800 атм).

Однако, любой опытный хроматографист предпочитает проводить анализы при возможно меньших значениях давлений. Чем выше давление, тем короче срок службы колонок, тем чаще нужно проводить замену уплотнений плунжеров и проводить обслуживание всей хроматографической системы.

Перед каждым пользователем хроматографа стоит проблема правильного выбора колонок. Графики, приведенные на рис. 15, демонстрируют преимущество использования колонок с классическим диаметром 4,6 мм по сравнению с колонками 2,1 мм. Повышение температуры элюента снижает

его вязкость, что позволяет проводить анализы при значительно меньших значениях давлений (рис. 15в). Таким образом, скоростные UHPLC разделения на графике скорость потока/давление смещаются в область больших значений потоков при больших температурах.

Однако, при прочих равных условиях, уменьшение диаметра колонки обеспечивает существенную экономию растворителя. Опыт использования тех и других колонок для массовых скоростных (<1 мин) анализов показывает, что экономия растворителя оборачивается резким сокращением времени жизни колонки. Так, использование коротких (15–30 мм) колонок диаметром 4,6 мм (Zorbax SB, 1,8 мкм) позволяет проводить в среднем до 15 тысяч анализов, в то время как срок службы колонок диаметром 2,1 мм, заполненных тем же сорбентом, сокращается до 2–2,5 тыс. анализов. При этом время жизни колонок (2,1 мм) от других изготовителей в тех же условиях составляет менее 900 анализов.

Agilent предлагает широкий ассортимент колонок для HPLC, рассчитанных на давление в 400 атм, на основе пористых сорбентов Zorbax™. Для работы в UHPLC области колонки марки RRTH позволяют работать при давлениях до 600 атм, в то время как колонки RRHD выдерживают давления до 1200 бар.

10. 1290 Infinity – универсальный хроматограф для любых методик HPLC и UHPLC

Возможность использования любой колонки в сочетании с самым малым внутренним объемом и высокой мощностью делает 1290 Infinity самым универсальным жидкостным хроматографом. Для имитации гидравлической системы любого хроматографа от разных изготовителей Agilent предлагает устройства для увеличения внутреннего мертвого объема. Таким образом снимается проблема воспроизводимости методик. Методики, поставленные на любом другом хроматографе, могут быть в точности воспроизведены на 1290 Infinity с тем, чтобы провести их дальнейшую оптимизацию.

11. Программное обеспечение и информационные технологии для 1290 Infinity

Для управления новым хроматографом Agilent Technologies предлагает несколько программных продуктов, полностью соответствующих требованиям ч. 11 гл. 21 свода федеральных нормативных документов FDA США об электронных записях и электронных подписях: **ChemStation версия 4.02**, или **EZChrom Elite** версии для сетевых решений. Кроме этого ПО **MassHunter**, которое разработано для управле-

ния, сбора и обработки данных от масс-детекторов (SQ, QQQ, IT, TOF, Q-TOF), также обеспечивает управление 1290 Infinity.

Развитие лабораторий контроля качества фармацевтических и пищевых продуктов, а также судебно-медицинских лабораторий или мониторинга окружающей среды неизбежно приводит к необходимости создания общелaborаторной информационной сети с выводом результатов измерений на уровень корпоративных программ (LIMS).

При работе с такими мощными программными продуктами, как LogiLab™, OpenLab™ ECM, ICM и(или) BPM новый хроматограф становится частью современной лаборатории, которая работает согласно с утвержденными протоколами исследований и в полном соответствии с международными требованиями к правилам организации работ в лабораториях (GLP) такого уровня.

12. Самый широкий выбор жидкостных хроматографов от Agilent Technologies

В настоящее время Agilent предлагает самый широкий спектр базовых моделей хроматографов (рис. 16) любой производительности, под любой бюджет, и покрывающие диапазон потоков от единиц нл до 100 мл в минуту. При разработке конструкции жидкостных хроматографов изначально стави-

лась задача сделать блоки моделей 1200, 1200 SL и 1290 Infinity совместимыми друг с другом. Такой подход позволяет пользователям существенно экономить средства при необходимости расширения возможностей прибора и приобретать дополнительные модули (их более чем 50), а не новый хроматограф. Пользователи могут выбрать конфигурацию хроматографа точно соответствующую задаче: от препаративных разделений на колонках диаметром более 9 мм до анализов следовых количеств белков с использованием колонок диаметром менее 100 мкм, впрыснутых в микрочип (рис. 16).

Контактная информация:

ООО «АЛСИ-ХРОМ»
Киев, 01042
ул. Ивана Кудри,
22/1, офис 70,
тел.: +38 (44) 521-95-40,
факс: +38 (44) 521-95-35
e-mail: lab@alsichrom.com
www.alsichrom.com



* * *

Таким образом, с выпуском хроматографа 1290 Infinity фирма Agilent Technologies ставит точку в многолетних дебатах относительно того, что следует называть UHPLC, а что нет, какие параметры жидкостного хроматографа необходимы для того, чтобы обеспечить работу в области UHPLC и пр. Универсальный Agilent 1290 Infinity по всем параметрам (и с большим запасом) является самым совершенным жидкостным хроматографом из всех, которые выпускаются в настоящее время. ■

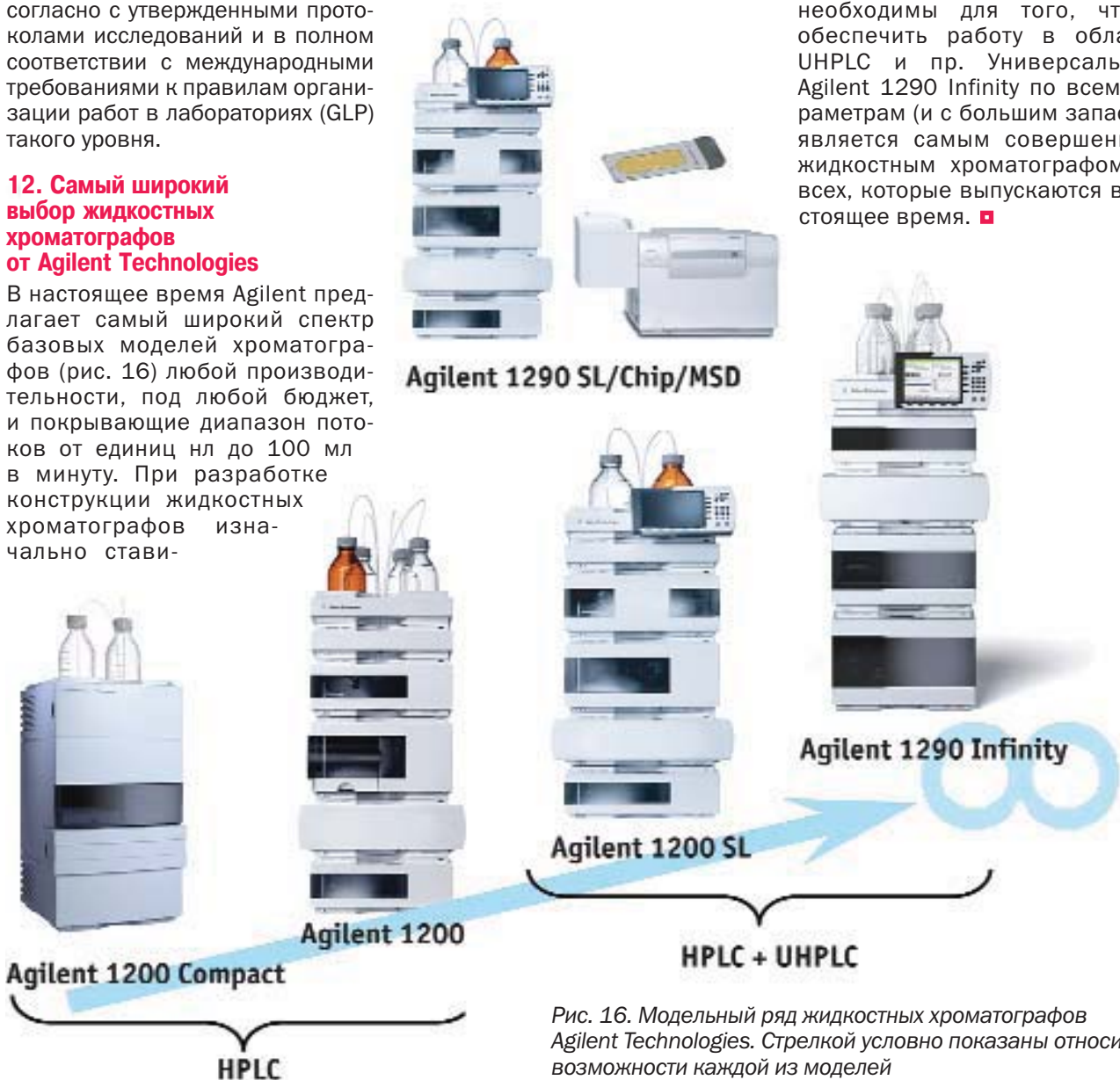


Рис. 16. Модельный ряд жидкостных хроматографов Agilent Technologies. Стрелкой условно показаны относительные возможности каждой из моделей