

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ НАУЧНОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ

Б.Г. Беленький, В.А. Готлиб

(Институт аналитического приборостроения АН СССР,
Ленинград),

Е.Е. Кевер

(Институт высокомолекулярных соединений АН СССР, Ленинград)

МИКРОКОЛОНОЧНАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

МикроВЭЖХ посвящено значительное число монографий [1-4] и обзорных статей. Ряд фирм выпускают высокоэффективные жидкостные хроматографы, оснащенные микроколонками (внутренним диаметром $d_c = 1 + 2.3$ мм). Поскольку основное преимущество микроЭВМ, связанное с уменьшением d_c , выражается в снижении расхода элюента, сорбента и массы пробы, чрезвычайно привлекательно создание микроколоночного хроматографа для эксклюзионной хроматографии полимеров (микрогельхроматографа) с целью анализа их молекулярно-массовых распределений (ММР). Действительно, специальные сорбенты для эксклюзионной хроматографии дороги, для анализа ряда полимеров (полиамидов, полиэфиров) применяются высокотоксичные растворители (перфторированные спирты или кислоты), а проблема определения молекулярной массы белков упирается в уменьшение массы пробы.

Микроколоночной эксклюзионной хроматографии посвящен ряд работ. Джино и Нишихара [5] использовали микроколонки 0.25×300 мм, упакованные TSK-гелем G-3000 (предел исключения $6 \cdot 10^4$ Да), и спектрофотометрический детектор для определения молекулярных масс (ММ) ненасыщенных полиэфиров. В работах [6-8, 10, 11] описано использование микроколоночной эксклюзионной хроматографии для анализа ММР полистиролов в диапазоне $2100 \div 3.65 \cdot 10^6$ Да. Показано, что разделение на колонке 0.6×330 мм, упакованной сорбентом лихросфер (Мерк), не уступает разделению на серии из двух колонок 3×500 мм и двух колонок 3×250 мм, упакованных аналогичными сорбентами. В работе [10] описан специальный микронасос с воспроизводимостью удерживаемых объемов 0.1 мкл, что обеспечивает 0.1-0.2 % воспроизводимостью удерживаемых объемов при микро-

экслюзионной хроматографии. Для этих целей в работе [11] предложены микроколонок с линейной молекулярно-массовой калибровочной зависимостью времен удерживания, t_R в диапазоне $ММ 3 \cdot 10^3 + 10^6$ Да. В работе [9] описано использование лазерного интерферометрического детектора с объемом измерительной ячейки 0.2 мкл для микроэкслюзионной хроматографии. При этом отмечена асимметрия пиков, увеличивающаяся с увеличением $ММ$ и скорости элюции. Для коррекции этой асимметрии использована специальная процедура [12].

В работах [13, 14] для анализа ММР олигомеров с помощью микроэкслюзионной хроматографии впервые использовались гибкие хроматографические колонки из плавленного кварца. Аналогичные колонки использовались и для анализа белков [15]. Применение подобных колонок внутренним диаметром 28 и 50 мкм, длиной до 90 см ($N \approx 90000$ т.т.) показало, что при экслюзионной хроматографии белков по сравнению с колонками обычных размеров у кварцевых микроколонок отсутствует адсорбция на внутренних стенках, и профиль скорости значительно меньше влияет на хроматографическое размывание.

В таблице сформулированы преимущества использования микроколонок в экслюзионной хроматографии. Все это создает специальную область использования микроэкслюзионной хроматографии, где она имеет решающие преимущества перед экслюзионной хроматографией на обычных колонках.

Создание микроколоночного гель-хроматографа представляет весьма сложную проблему, поскольку связано с разработкой высокочувствительного рефрактометрического детектора с объемом ячейки менее 0.1 мкл и обеспечением высокой (0.1–0.3 %) воспроизводимости времен удерживания при коэффициенте распределения $K_d \leq 1$. К этим вопросам не сводятся все трудности

создания микроколоночного гель-хроматографа. Останутся еще проблемы высокoeffективных микроколонок для экслюзионной хроматографии с линейной молекулярно-массовой калибровочной зависимостью, система калибровки и обработки информации. Все эти задачи успешно решены при создании микроколоночного гель-хроматографа в Научно-техническом объединении (НТО) АН СССР. В настоящей статье рассмотрены наиболее специфичные вопросы микроколоночной гель-хроматографии: достижение воспроизводимости удерживаемых объемов, соответствующих воспроизводимости гель-хроматографа с обычными колонками ($d_c = 4$ мм), и создание высокочувствительного рефрактометрического детектора с объемом измерительной ячейки $V_d \leq 0.1$ мкл.

Если обратиться к общим проблемам микроВЭЖХ, следует иметь в виду, что уменьшение d_c связано с определенными ограничениями, которые прежде всего заключаются в трудностях миниатюризации измерительной ячейки и гидравлической системы хроматографа. Имеется компромиссное решение с переходом к колонкам $d_c = 1 + 2$ мм, которые могут работать с детектором и возвратно-поступательным насосом, используемым

ми в обычной ВЭЖХ, только соответственно с уменьшением объема измерительной ячейки детектора и рабочего объема камеры насоса. Переход к колонкам $d_c \leq 1$ мм уже не обеспечивается дальнейшей миниатюризацией возвратно-поступательного насоса и требует применения шприцевого микронасоса. Последний наряду с преимуществами более простой конструкции (отсутствие клапанной системы, сложных кулачков) и беспульсационности имеет серьезный недостаток, связанный с увеличением отношения объемов камеры насоса и колонки, что сказывается на ухудшении воспроизводимости времен удерживания. С другой стороны, уменьшение d_c и, как следствие этого, уменьшение измерительной ячейки детектора изменяет условия детектирования и ограничивает применение некоторых видов детекторов, прежде всего фотометрического (спектрофотометрического), не

Микроколонки в эксклюзионной хроматографии

Достижимый эффект	Реализация
1. Уменьшение расхода элюента, использование высокотоксичных растворителей	Анализ ММР полиэфиров и полиамидов с использованием перфторированных спиртов и кислот
2. Уменьшение массы анализируемого полимера	Определение ММ и ММР труднодоступных биополимеров и синтетических полимеров (исследование новых полимеров)
3. Сверхэффективные колонки, за счет высококачественной упаковки сорбентом и снижения пагубного влияния уменьшения коэффициента диффузии у полимеров на размывание за счет профиля скорости	Анализ ММР олигомеров и низкомолекулярных добавок к полимерам, прецизионный анализ ММР полимеров
4. Использование экзотических элюентов, прецизионных сорбентов и калибровочных стандартов	Физико-химические исследования полимерных растворов, прецизионный анализ ММР полимеров
5. Уменьшение потерь полимеров и белков из-за адсорбции на стенках колонки и сорбенте (за счет увеличения соотношения масс солюта и сорбента)	Следовый анализ, повышение точности анализа высокомолекулярной фракции полимеров
6. Скоростное разделение	Мониторинг полимеризации и деструкции полимеров во втором (изократическом) каскаде при двумерной хроматографии макромолекул

говоря уже о потоковых детекторах (например, масс-спектрометрического), чувствительность которых падает пропорционально уменьшению d_c колонки. Таким образом, имеется ряд общих проблем микроВЭЖХ, нуждающихся в обсуждении и исследовании.

С этой целью жидкостный хроматограф можно условно разделить на две части: 1) хроматографическую, где хроматографируется проба и физико-химические параметры которой обуславливают качество и воспроизводимость хроматограмм и 2) техническую, обеспечивающую создание давления в гидравлической системе для подачи элюента, формирование сигнала детектора, автоматический режим работы прибора, его кондиционирование и обработку информации. Улучшение качества хроматографа — переход от обычной к ВЭЖХ и, наконец, к микроВЭЖХ проходило путем оптимизации все большей части элементов хроматографа и их мобилизации в его оптимизированную хроматографическую часть. На заре развития жидкостной хроматографии она включала только хроматографическую колонку. При переходе к ВЭЖХ с ее требованием высокой эффективности хроматографического разделения (минимизации размывания хроматографической зоны), качество хроматограммы стало определяться не только эффективностью колонки, но и размыванием в экстраколonoчной части хроматографа: дозаторе, измерительной ячейке детектора, жидкостных коммуникациях, а также с отличной от нуля постоянной времени детектирующей системы. Таким образом, в хроматографическую часть жидкостного хроматографа оказались включенными оптимизированные экстраколonoчные элементы прибора. Переход к микроколонкам и шприцевым насосам, объем камеры которых значительно превосходит объем колонок, безусловно требует включения в хроматографическую часть прибора оптимизированной гидравлической части системы подачи элюента, ибо изменение давления и температуры элюента в относительно большой камере насоса изменяет объемную скорость подачи элюента, а следовательно, и времена удерживания компонентов.

Вопросы оптимизации микроВЭЖХ достаточно подробно рассмотрены в литературе [1-4, 16]. Однако оптимизация шприцевого насоса для работы с микроколонкой является новой для ВЭЖХ и в литературе подробно не освещалась. Недооценка этой проблемы, по нашему мнению, явилась основной трудностью в создании микроколonoчных жидкостных хроматографов с колонками $d_c \leq 1$ мм, которая лишь сейчас успешно преодолевается.

Следует учесть, что система подачи элюента работает не только в стационарном (при подаче элюента с постоянной скоростью), но и в переходных режимах, связанных с изменением давления в камере насоса (при включении насоса и различных помехах). Отсюда при большом соотношении объемов камеры насоса и микроколонки невозможно обеспечить малые времена переходного процесса стабилизации объемной скорости элюента при изменении давления в камере насоса, которое в силу сжимаемости жидкости происходит не мгновенно, а с некоторой

постоянной времени t . Эта же величина характеризует изменение скорости подачи элюента (при постоянной скорости движения плунжера насоса), а следовательно, и времени удерживания пробы. t связана с изменением гидравлического сопротивления колонки за счет изменения плотности упаковки хроматографической насадки, засорения фильтра, изменения температуры колонки, а также и изменения температуры растворителя в камере насоса с соответствующим изменением его плотности, влияющим на объемную скорость элюента.

Следует иметь в виду, что эти помехи неравноценны с точки зрения возможности их устранения. Относительно легко обеспечить надежное термостатирование камеры насоса и хроматографической колонки, значительно труднее исключить небольшие изменения гидравлического сопротивления колонки вследствие засорения фильтров (или освобождения их от застрявших в порах частиц). Поэтому оптимизации гидравлической части системы подачи элюента, необходимой для устранения влияния температурных колебаний, может быть противопоставлено температурное кондиционирование камеры насоса и колонки. Другое дело засорение фильтров. Если не считать требования обеспыливания элюента и пробы (трудно выполнимое при миниатюризации ВЭЖХ), то оптимизации гидравлической системы, направленной на уменьшение ее объема, альтернативы нет.

Вопросы стабильной работы гидравлической системы микроколоночного хроматографа особенно остро стоят при эксклюзивной микроколоночной хроматографии, где объемы удерживания вследствие $K_d \leq 1$ малы, и таким образом требуемая для точного определения ММР 0.2–0.3 % воспроизводимость удерживаемых объемов налагает особые требования к прецизионности подачи элюента. Особые требования предъявляются также к необходимому для эксклюзивной хроматографии рефрактометрического детектору и микроколонкам, обеспечивающим высокую селективность и эффективность разделения макромолекул. Прежде всего остановимся на системе подачи элюента.

Оптимизация системы подачи элюента

Переходные процессы при изменении режима подачи элюента в системе шприцевой насос-колонки рассмотрены в работе [17]. При работе насоса плунжер площадью S_n перемещается со скоростью u_n и вытесняет элюент из камеры объемом V_n в колонку с гидравлическим сопротивлением K . В предположении, что объем колонки много меньше V_n и изменение объема элюента в камере насоса мало по сравнению с V_n , получено уравнение, описывающее изменение во времени давления в камере ΔP с учетом термического расширения жидкости (с коэффициентом β) и сжимаемости элюента (с коэффициентом α):

$$V_H \left(\beta \frac{dP}{dt} + \alpha \frac{dT}{dt} \right) + \frac{\Delta P}{K} - Q = 0, \quad (1)$$

где t — время; T — температура; $Q = u_H S_H$ — объемная скорость перемещения плунжера; $\Delta P/K$ — объемная скорость элюента в колонке.

Регистрируемое в эксперименте время удерживания t_R связано с объемом удерживания V_R и давлением в камере насоса P соотношением

$$V_R = \frac{1}{K} \int_0^{t_R} \Delta P dt.$$

При этом в изотермических условиях ($dT/dt = 0$) решение (1) при начальном условии

$$P|_{t=0} = P_0,$$

где P_0 — давление в камере насоса в момент ввода пробы, имеет вид:

$$P = P_0 e^{-t/\tau_H} + P_\infty \left(1 - e^{-t/\tau_H} \right). \quad (2)$$

Здесь стационарное давление $P_\infty = QK$, а τ_H играет фундаментальную роль в оптимизации гидравлической системы хроматографа. Время переходного процесса $\tau_H = V_H \beta K$. Условие минимизации τ_H определяет необходимость уменьшения V_H при росте K .

В идеальных условиях при отсутствии сжимаемости элюента ($\beta = 0$) и $dT/dt = 0$, время удерживания определяется как

$$t_R = V_R/Q.$$

В качестве меры неидеальности системы, характеризующей воспроизводимость хроматографического эксперимента, целесообразно использовать величину $|\Delta t_R/t_R|$, где $\Delta t_R = t_R - t_R^0$.

Из уравнения (2) может быть получена зависимость $|\Delta t_R/t_R|$ от параметров эксперимента ($P_0, P_\infty, t_R, \tau_H$):

$$\left| \frac{\Delta t_R}{t_R} \right| = \left(1 - \frac{P_0}{P_\infty} \right) \frac{\tau_H}{t_R} \left(1 - e^{-t_R/\tau_H} \right). \quad (3)$$

В случае, когда проба вводится в хроматограф в стационарном режиме ($P_0 = P_\infty$), $\Delta t_R/t_R = 0$. Формула (3) позволяет

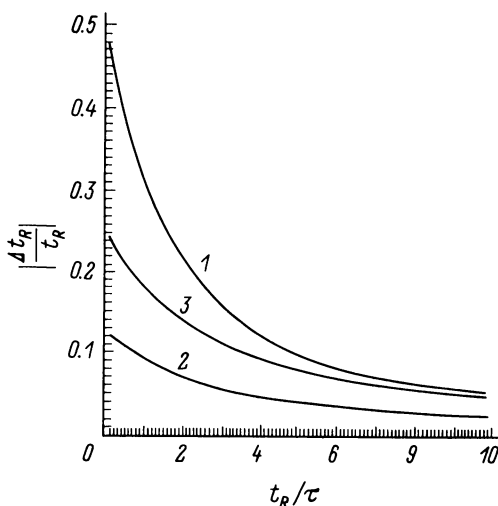


Рис. 1. Зависимость относительного отклонения времени удерживания $|\Delta t_R/t_R|$ от t_R/τ при вводе пробы от времени переходного процесса (кривая 1, $P_0/P_\infty = 0.5$) при засорении фильтра (кривая 2, $K/K' = 0.5$), при скачкообразном изменении температуры системы (кривая 3, $\alpha T/\beta P = 0.5$)

определить время выхода хроматографа на стационарный режим ($P = P_\infty$) при $P_0 = 0$.

Зависимость (3) приведена на рис. 1 (кривая 1). Эта зависимость показывает, что с уменьшением τ_H уменьшается $|\Delta t_R/t_R|$. Если задать величину $|\Delta t_R/t_R|$ и время удерживания t_R , то кривая 1 позволяет определить τ_H и, следовательно, параметры гидравлической системы хроматографа ($\tau_H = V_H \beta K$), обеспечивающие его работу с заданной воспроизводимостью.

В работе [17] рассмотрено влияние некоторых помех в системе подачи элюента на $|\Delta t_R/t_R|$:

а) изменение сопротивления колонки в процессе анализа, K , вследствие засорения фильтра. При изменении в момент t' гидравлического сопротивления колонки от K до K' давление в камере насоса возрастает от $P_\infty = QK$ до $P'_\infty = QK'$ за время $\tau'_H = V_H \beta K'$. При этом $|\Delta t_R/t_R|$ определяется уравнением

$$\left| \frac{\Delta t_R}{t_R} \right| = \frac{1}{2} \left[1 + \frac{K}{K'} \right] \frac{\tau'_H}{t_R} \left[1 - \frac{\tau'_H}{t_R} \left[1 - e^{-t_R/\tau'_H} \right] \right], \quad (4)$$

зависимость (4) изображена на рис. 1 (кривая 2);

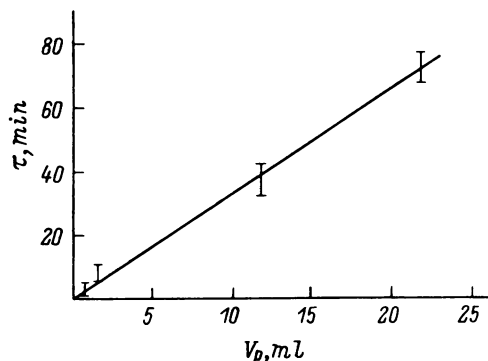


Рис. 2. Зависимость времени релаксации τ от объема жидкостной системы. Хроматограф ХЖ1309, колонка 0.5×300 мм, скорость элюции — 6 мкл/мин. МЭК, давление $\Delta P = 3.0$ МПа после создания скачка $P = \pm 1.0$ МПа

б) изменение температуры камеры насоса (тепловой удар). Если в момент времени t' температура камеры насоса изменится на ΔT , то это приведет к скачкообразному возрастанию давления на величину $\Delta P = -(\alpha/\beta) \Delta T$. В течение времени порядка $\tau_{\text{н}}$ вновь устанавливается стационарное давление $P = P_{\infty}$. При этом $\Delta t_R/t_R$ определяется уравнением

$$\left| \frac{\Delta t_R}{t_R} \right| = \frac{\alpha}{\beta} \frac{\Delta T}{KQ} \frac{\tau_{\text{н}}}{t_R}. \quad (5)$$

Зависимость (5) изображена на рис. 1 (кривая 3). В ситуации, когда рассмотренные источники нестабильности действуют одновременно, соответствующие $\Delta t_R/t_R$ складываются.

Вопросы нестабильности подачи элюента являются ключевыми при конструировании микроколоночного гель-хроматографа. Экспериментальная зависимость времени стабилизации $\tilde{\tau}_{\text{н}}$, которое пропорционально $\tau_{\text{н}}$ и логарифму амплитуды возмущающего фактора (ΔP , ΔT , ΔK), от объема $V_{\text{н}}$ системы подачи элюента показана на рис. 2. Видно, что когда объем системы $V_{\text{н}} \leq 1$ мл, то при перепаде давления в 1 МПа, $\tilde{\tau}_{\text{н}} \approx 2$ мин. При характерных для реального эксперимента перепадах давления 0.1 МПа, $V_{\text{н}} \approx 1$ мл обеспечивает хорошую (≈ 0.1 %) воспроизводимость t_R .

Таким образом, использование микроколонок ($d_c < 1$ мм) требует максимального уменьшения объема системы подачи элюента ($V_n < 1$ мл) и ее термостатирования с амплитудой $\Delta T < P_\infty (\alpha/\beta) \delta$, где δ — допустимая величина $|\Delta t_R/t_R|$.

Рефрактометрический детектор для эксклюзионной микроколоночной хроматографии

Для эксклюзионной хроматографии полимеров оптимальным детектором является рефрактометрический. Его достоинствами являются: 1) универсальные возможности детектирования всех классов веществ с чувствительностью $d_n/d_c \approx 0.001$ ед. рефракции/1 %; 2) чувствительность, пропорциональная весовой концентрации, что особенно удобно для определения на основе эксклюзионной хроматографии ММР полимеров, а также для анализа смесей, состоящих из веществ разной химической природы (например, пептидов белкового гидролизата, олиго- и полисахаридов); 3) в то время, как использование фотометрического (спектрофотометрического), флуориметрического и электрохимического детекторов выдвигает, соответственно, требования оптической прозрачности на волне детектирования, отсутствия собственной флуоресценции или электрохимической активности элюента, использование рефрактометрического детектора связано с необходимостью выполнения легче реализуемого требования к элюенту — иметь достаточно высокий инкремент показателя преломления.

Вместе с тем рефрактометрический детектор имеет и недостатки, главным из которых является то, что сигнал детектора определяется не только изменением концентрации анализируемого вещества, но и физическим состоянием (плотностью, которая зависит от температуры и давления) и химической стабильностью растворителей во время эксперимента. И, поскольку в измерительной ячейке рефрактометра растворителя в 10^5 — 10^7 раз больше, чем анализируемого вещества, эти особенности рефрактометрического детектирования становятся решающими при его выборе для конкретного хроматографического анализа и конструировании детектора. Так, рефрактометрический детектор совершенно непригоден при хроматографии с программированием состава элюента и обязательно требует дифференциальной схемы детектирования, основанной на сравнении показателя преломления элюента и элюата в условиях высокостабилизированных в обоих каналах температуры и давления. К счастью, эксклюзионная хроматография является изократическим методом, а современные конструкции дифференциальных рефрактометров обеспечивают предельно детектируемое изменение показателя преломления $\Delta n = 2 \cdot 10^{-8}$ ÷ $5 \cdot 10^{-8}$ ед. рефракции, что при инкременте показателя преломления $\Delta n = 10^{-3}$ ед. рефракции/1 % позволяет детектировать изменение

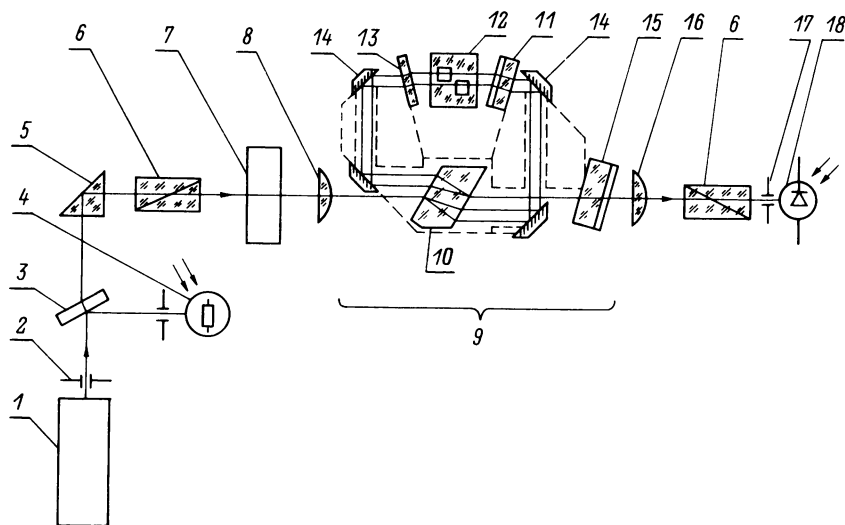


Рис. 3. Оптическая схема лазерного рефрактометрического детектора микроколоночного хроматографа ХЖ1309: 1 — гелий-неоновый лазер ЛГ-72; 2 и 17 — диафрагмы; 3 — стеклянная пластинка; 4 — фотосопротивление; 5 — призма; 6 — поляризаторы; 7 — электрооптический модулятор на основе кристалла ДКДР; 8 и 16 — линзы; 9 — моноблок поляризационного интерферометра; 10 — плоскопараллельная пластинка из кальцита; 11 — полуволновая пластинка; 12 — оптическая кювета; 13 — защитное стекло; 14 — зеркала; 15 — четвертьволновый компенсатор; 18 — фотодиод

концентрации $\Delta c = 2 \cdot 10^{-5} \div 5 \cdot 10^{-5} \%$. Последнее обеспечивает анализ полимеров с помощью эксклюзионной хроматографии до $M = 5 \cdot 10^6$ Да без учета концентрационных эффектов. Однако использование микроколоночного варианта эксклюзионной хроматографии выдвигает дополнительное требование миниатюризации измерительной ячейки рефрактометрического детектора. Это вызывает помимо чисто оптических трудностей увеличение отношения поверхности к объему измерительной ячейки, что повышает влияние загрязнения поверхности во время эксперимента (увеличивает память детектора). Последнее обстоятельство отвергает использование в качестве рефрактометрического детектора для микроколоночной эксклюзионной хроматографии гониометрического рефрактометра (метод поллой призмы) и френелевского рефрактометра. Действительно, основным недостатком рефрактометра Френеля заключается в том, что он определяет показатель преломления в тонком ($\sim \lambda$) слое жидкости у стенки ячейки, где состав жидкости может существенно отличаться от состава жидкости в ее объеме.

Недостатки гониометрического метода связаны с малоудобной формой ячейки с плохо протекаемыми зонами, а также с

тем, что в случае применения необходимого при столь малых апертурах лазерного источника возникает достаточно сложная задача исключения влияния нестабильности оси диаграммы направленности лазерного излучения, величины которой на 2—3 порядка превышают характерные угловые отклонения пучка при изменении Δl на величины 10^{-7} – 10^{-8} ед. рефракции.

Для микроколоночной эксклюзионной хроматографии наиболее приемлемым рефрактометрическим детектором является поляризационный интерферометр, поскольку здесь может быть использована малообъемная ($V_d = 0.1$ мкл) прямоочная измерительная ячейка, состыкованная в торец с хроматографической колонкой, и при этом обеспечена чувствительность на уровне $(2 \div 5) \cdot 10^{-8}$ ед. рефракции.

Этот детектор [18] (его принципиальная схема приведена на рис. 3) реализует интерференционно-поляризационный (ИП) метод измерения Δl , сущность которого заключается в следующем. Исходный поляризованный световой пучок расщепляет на два когерентных ортогонально поляризованных световых пучка, которые пропускают через сравнительные среды, а затем пространственно совмещают. Суперпозиция двух ортогонально поляризованных когерентных световых пучков равной интенсивности приводит к образованию эллиптически поляризованного светового пучка. Поскольку связанное с Δl изменение оптической разности хода совмещаемых пучков приводит к изменению состояния поляризации результирующего светового пучка, задача измерения Δl сводится к анализу состояния поляризации. При этом, если до совмещения световые пучки были пропущены через дифференциальную плоскопараллельную кювету с длиной ячеек l , то изменение разности фаз $\Delta\theta$ компонент эллиптически поляризованного света связано с Δl сравниваемых сред соотношением

$$\Delta\theta = \frac{2\pi l}{\lambda} \Delta n,$$

где λ — длина волны.

Для построения рефрактометров используют самые разнообразные схемы поляризационных интерферометров [19–23]. Однако, проведенный анализ показал, что заметные преимущества (как по сравнению с интерферометрами, работающими в естественном свете, так и по сравнению с другими типами рефрактометров) обеспечивают схемы, использующие двухлучепреломляющие расщепители световых пучков, поскольку конструктивные особенности таких систем (небольшая величина пространственного смещения световых пучков, компактность оптической схемы, меньшая чувствительность к параллельным смещениям расщепителей) обеспечивают более высокую помехозащищенность.

Схема [18], приведенная на рис. 3, — одна из наиболее удачных. Высокая долговременная стабильность (низкий дрейф) и низкий уровень шумов, как это показано на рис. 4, достигаются за счет использования системы уголковых отражателей,

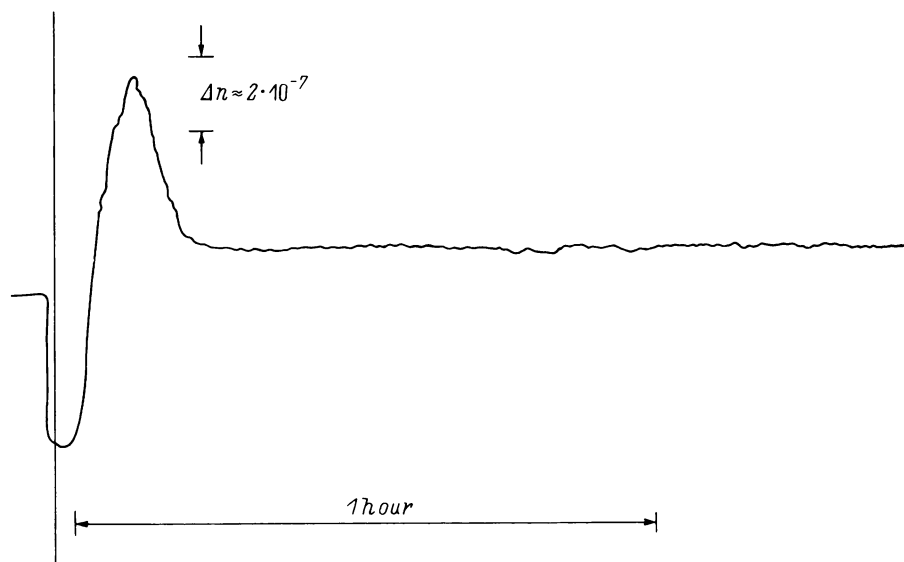


Рис. 4. Пример записи выходного сигнала лазерного рефрактометрического детектора микроколоночного хроматографа ХЖ1309 с момента включения прибора

смонтированной в моноблок из ситала, и одной плоскопараллельной пластинкой из кальцита (10), расщепляющей поляризованный световой луч на два ортогонально поляризованных пучка равной интенсивности, которые после прохождения полуволновой пластинки (11), измерительной и сравнительной ячеек (12) совмещаются этой же кальцитовой пластиной (10) в один пучок. Непосредственно на моноблоке установлена и $\lambda/4$ пластинка—компенсатор (13). Помимо компактности эта схема обеспечивает высокую стабильность детектора, так как ни изменение направления распространения излучения, ни изменение положения плоскопараллельной кристаллической пластины, ни изменение положения системы зеркал в целом не приводят к изменению разности интерферирующих световых пучков. Кроме того, в этом решении удастся снизить напряжение в кристаллической пластине.

Измерительная и сравнительная ячейки детектора выполнены прямоточными в виде прямоугольных каналов 0.5×0.5 мм. При этом геометрическая длина пути света в ячейке равна 0.5 мм, а ее объем (объем отрезка канала, соответствующего высоте пропускаемого светового пучка, 0.3 мм) составляет примерно 75 нл.

Особую сложность представляет термостатирование жидкости в измерительной и сравнительной ячейках (здесь допустимая $\Delta T \leq 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$). Эта задача облегчается тем, что кювета и хроматографическая колонка заключены в единый блок теплообмен-

ника из красной меди, который поддерживается при постоянной температуре с помощью термостатируемой в пределах ± 0.05 °C от внешнего ультратермостата рубашки. Последняя окружает кюветно-колоночный блок, но не находится с ним в непосредственном тепловом контакте. Заполнение растворителем сравнительной ячейки осуществляется и хроматографической колонкой путем переключения трехходового крана, размещенного у кюветы в термостатируемом пространстве.

Указанная схема реализована в детекторе микроколоночного хроматографа ХЖ1309 (НТО АН СССР) и обеспечивает следующие параметры: $\Delta n = 2 \cdot 10^{-8}$ ед. рефракции, $V_d = 0.1$ мкл, $d(\Delta n)/\Delta n = 0.5$ %. Описанная схема вполне применима и для капиллярной ($d_c < 0.5$ мм) ВЭЖХ (КЖХ), так как использование лазерного источника излучения допускает существенное уменьшение поперечного сечения светового пучка, а следовательно, и объема измерительной ячейки. Если измерительная ячейка является продолжением капиллярной колонки, то ее объем равен $\pi d_c^2 h/4$, где h — высота светового пучка, при этом чувствительность детектора к изменению показателя преломления Δn уменьшается пропорционально d_c . Таким образом, простейшая оценка дает, что для $d_c = 0.1$ мм объем кюветы окажется равным 1 нл (если $h = 0.1$ мм), а пороговая чувствительность не хуже $2.5 \cdot 10^{-7}$, для $d_c = 0.2$ мм, объем кюветы составит 4 нл, а чувствительность будет не хуже 10^{-7} ед. рефракции. На практике же можно ожидать, что чувствительность сохранится на уровне $\Delta n \approx 5 \cdot 10^{-8}$, так как чувствительность этого детектора лимитируется неоднородностью растворителя. Следовательно, можно ожидать, что при использовании колонок с $d_c = 0.2$ мм пороговая чувствительность детектора по массе вещества окажется ≈ 1 пг.

Микроколоночный гель-хроматограф

Развитая выше современная концепция микроколоночного хроматографа для эксклюзионной хроматографии была положена в основу конструирования микроколоночного гель-хроматографа типа ХЖ1309 и его последующих модификаций ХЖ1309М и ХЖ1315 (НТО АН СССР) (рис. 5) с рефрактометрическим (интерференционно-поляризационным) детектором с объемом измерительной ячейки $V_d = 0.1$ мкл, флуктуационным шумом менее $5 \cdot 10^{-8}$ ед. рефракции, воспроизводимостью амплитуды сигнала ~ 0.5 % и колонками из фторопласта $d_c = 0.5$ мм. Использование фторопластовых колонок вместо значительно более эффективных (см. таблицу) колонок из гибких кварцевых капилляров связано с



Рис. 5. Жидкостный хроматограф ХЖ1315 (НТО АН СССР). Расход элюента 0.5–30 мкл/мин, нестабильность насоса 0.1 %. Рабочее давление 12 МПа. Колонка 0.5×300 мм. Объем дозирования 0.04; 0.2; 0.5; 0.75 и 1 мкл. Соединительный объем колонки и измерительной ячейки детектора 0.1 мкл. Рефрактометрический детектор, пределы измерения: $0-0.5 \cdot 10^{-6}$; $0-1.0 \cdot 10^{-5}$; $0-2 \cdot 10^{-5}$; $0-4 \cdot 10^{-5}$; $0-8 \cdot 10^{-5}$ ед. рефракции. Предельная чувствительность $5 \cdot 10^{-5}$ ед. рефракции. Объем измерительной ячейки 0.1 мкл. Габаритные размеры 580×710×175 мм. Масса 70 кг

тем, что объем измерительной ячейки детектора позволяет использовать колонки диаметром $d_c = 0.5$ мм. А кварцевые колонки такого диаметра теряют гибкость и становятся хрупкими. Кроме того, эластичная стенка фторопластовой колонки, если ее заполнять при давлении, значительно превышающем рабочее, обжимает упакованный в колонке сорбент (радиальная компрессия), повышая эффективность колонки ($N = 15.000-20.000$ т.т. на длине 350 мм). Объем термостатированной системы подачи элюента этого хроматографа $V_H = 1.5$ мл обеспечивает воспроизводимость $\Delta t_R/t_R$ в пределах 0.1–0.2 %, что позволяет определять ММ с воспроизводимостью порядка 1 %, соответствующей воспроизводимости анализа ММР на современных высокоэффективных гель-хроматографах с обычными колонками. Микроколоночный хроматограф ХЖ1309М, благодаря высокой коррозионной стойкости гидравлической системы, изготовленной из титан-циркониевого сплава, способен работать с

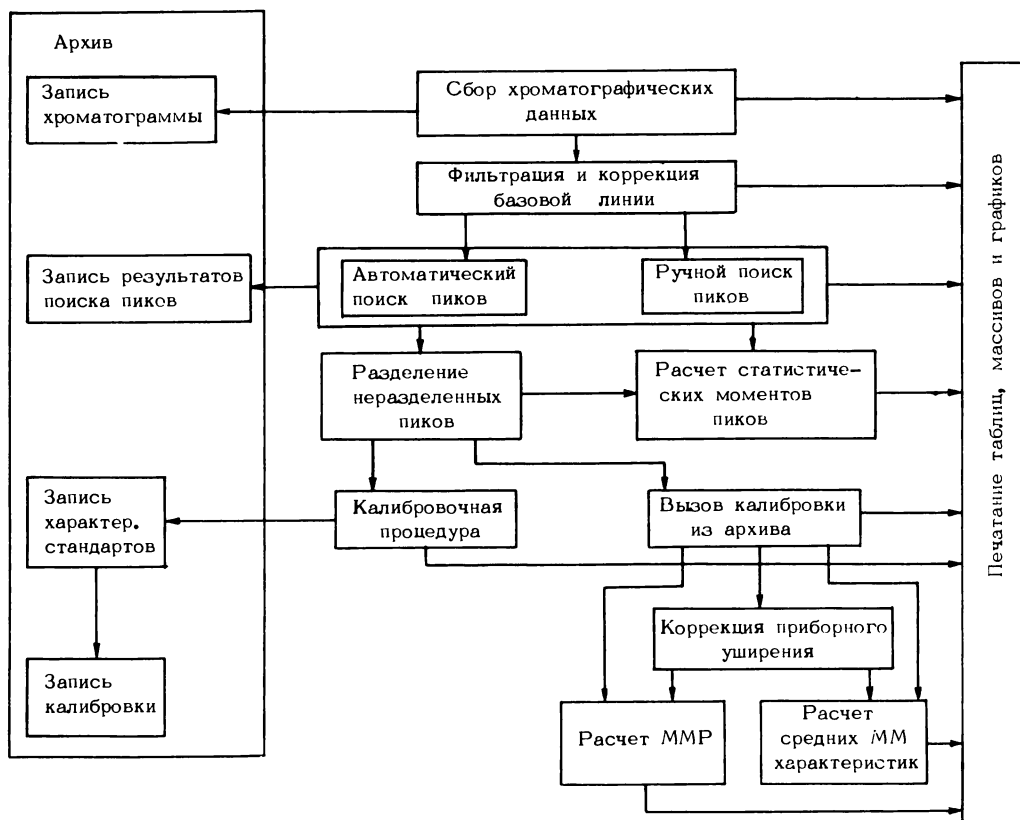


Рис. 6. Структура системы компьютерной обработки информации хроматографа ХЖ1315

любими, в том числе коррозионно активными элюентами при расходе на один анализ ММР полимеров ~50 мкл (~1 капли) растворителя. ХЖ1309М снабжен совершенной системой компьютерной обработки информации (рис. 6).

На рис. 7 и 8 показаны хроматограммы полистирольных стандартов, полученные на хроматографе ХЖ1309. На рис. 7 сорбент: смесь микросферических силикагелей „Nucleosil“, $d_p = 5$ мкм с линейной калибровкой. Элюент — МЭК, скорость элюции 7.6 мкл/мин. Концентрация ПС-стандартов 0.1 мг/мл каждого, объем пробы $V_s = 0.06$ мкл, $M =$ (1) $3 \cdot 10^6$; (2) $8.3 \cdot 10^5$; (3) $4.02 \cdot 10^5$; (4) $1.96 \cdot 10^5$; (5) $97.2 \cdot 10^4$; (6) $5.5 \cdot 10^4$; (7) $2.6 \cdot 10^4$; (8) $1.3 \cdot 10^4$; (9) $5 \cdot 10^3$; (10) $9.025 \cdot 10^3$; (11) $4.8 \cdot 10^2$; (12) 78 (бензол). На рис. 8 сорбент: силикагель „Silpearl“ (ЧСР), $d_p = 5.5$ мкм, элюент—МЭК, скорость элюции 2 мкл/мин. Объем пробы $V_s = 0.06$ мкл (ДФЭ — дифенилэтан).

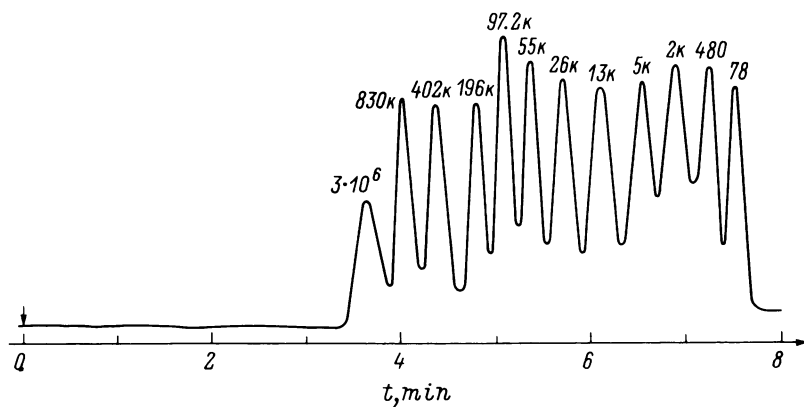


Рис. 7. Разделение смеси ПС-стандартов на фторопластовой микроколонке 0.5×350 мм, $N = 20000$ т.т.

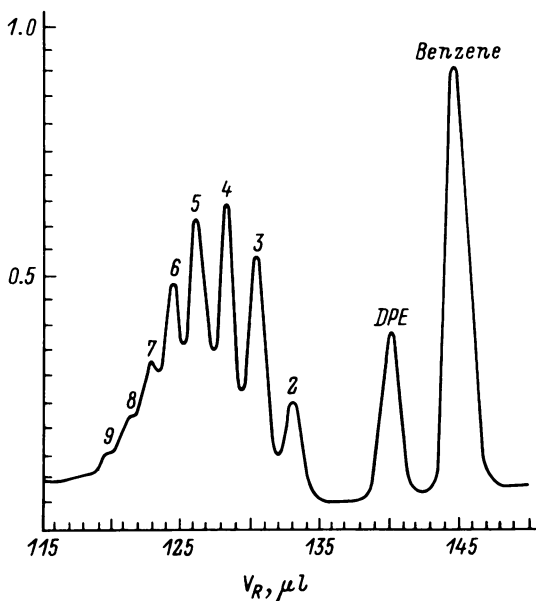


Рис. 8. Разделение олигомеров стирола $M_n = 480$ на фторопластовой колонке 0.5×1000 мм, $N = 60000$ т.т.

Рис. 9 демонстрирует калибровочную зависимость V_R от $\lg M$ для колонки гель-хроматографа ХЖ1309, полученную с использованием различных полистирольных стандартов. Элюент: ме-

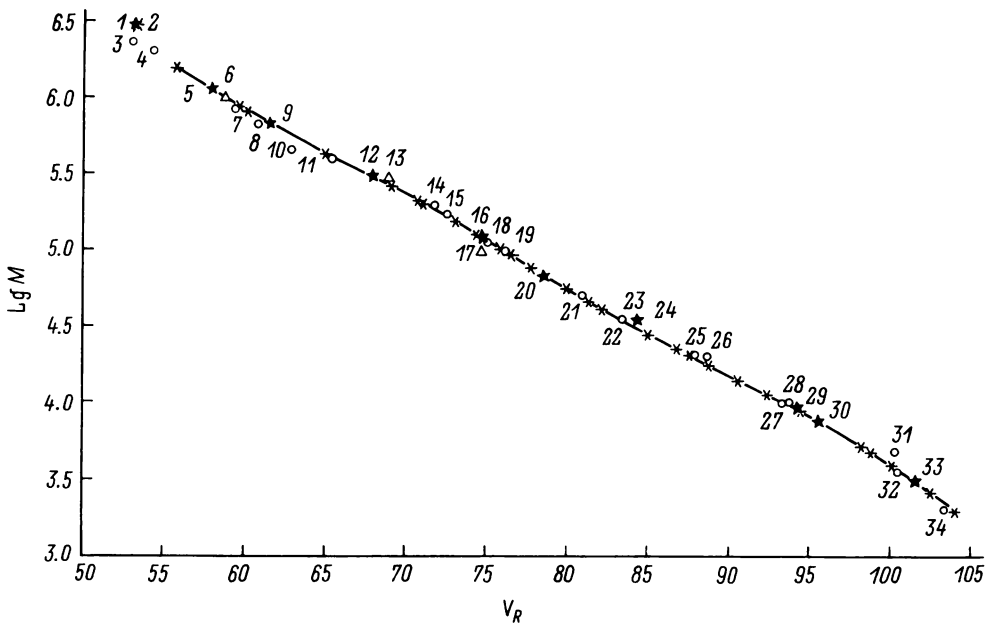


Рис. 9. Калибровочная зависимость V_R от $\lg M$ для ПС-стандартов, полученная на колонке 0.5×730 мм ($N = 35000$ т.т.), упакованных смесью силикагелей „Nucleosil“ с линейной молекулярно-массовой калибровочной зависимостью

тил-этилкетон, скорость 3 мкл/мин. ПС-стандарты: ИВС АН СССР (*), Waters Ass. (о), Altex (Δ) и Polymer Laboratories (*). M_p партий ПС:

1 — 3000 К (Δ , № 902-64); 2 — 2950 К (*, № 20145-1); 3 — 2300 К (о, № 61970); 4 — 1987 К (о, № 61970); 5 — 1130 К (*, № 20141-1); 6 — 1000 К (Δ , № 902-63); 7 — 830 К (о, № 25167); 8 — 655 К (о, № 25167); 9 — 675 К (*, № 20140-1); 10 — 451 К (о, № 25166); 11 — 402 К (о, № 25166); 12 — 370 К (*, № 20138-1); 13 — 300 К (Δ , № 902-62); 14 — 196 К (о, № 41984); 15 — 171 К (о, № 41984); 16 — 120 К (*, № 20135-7); 17 — 100 К (Δ , № 902-61); 18 — 111 К (*, № 41995); 19 — 97.2 К (о, № 41995); 20 — 68 К (*, № 20134-1); 21 — 50 К (о, № 25170); 22 — 34.5 К (о, № 25170); 23 — 34.5 К (Δ , № 902-60); 24 — 34.5 К (*, № 20132-2); 25 — 20.5 К (о, № 25168); 26 — 19.75 К (о, № 25168); 27 — 9.8 К (о, № 25171); 28 — 10 К (о, № 25171); 29 — 9.4 К (*, № 20129-1); 30 — 7.6 К (о, № 20128-1); 31 — 4.8 К (о, № 25169); 32 — 3.55 К (о, № 25169); 33 — 3.1 К (*, № 20126); 34 — 2.025 К (о, № 61971).

Рис. 10 демонстрирует эксклюзионную хроматографию белков, позволяющую достаточно точно (в пределах 2 %) опреде-

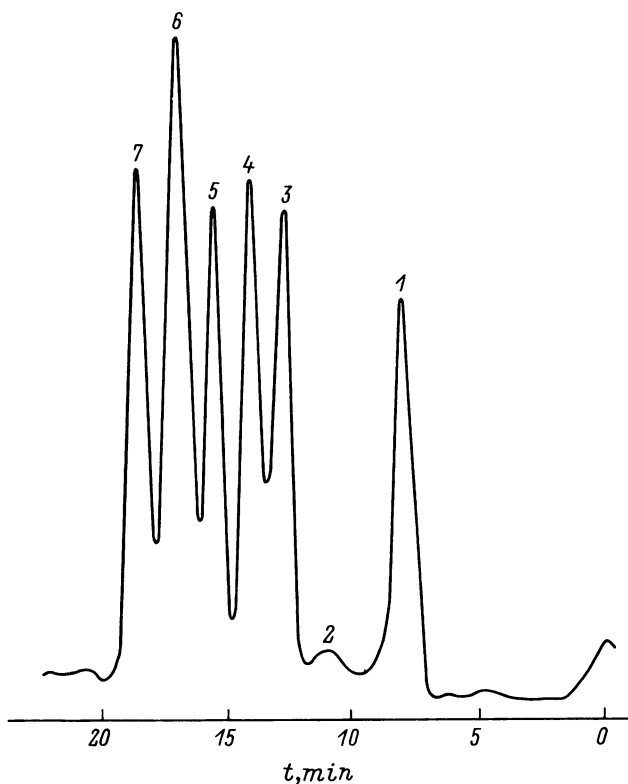


Рис. 10. Разделение смеси белков на колонке 0.5×300 мм; $N = 10000$ т.т.

лить их ММ при пробе 50 нг белкового препарата. Сорбент: TSK-3000 sw, $dp = 10$ мкм, дополнительно обработанный глицидилпропилтриметоксисиланом. Элюент: фосфатный буфер pH 6.8:0.2 М NaCl. Хроматограф ХЖ1309М. 1 — тиреоглобулин ($M = 6 \cdot 10^5$ Да); 2 — бычий сывороточный альбумин (БСА) — димер ($1.3 \cdot 10^5$ Да); ($M = 1.36 \cdot 10^4$ Да); 3 — БСА ($M = 6.5 \cdot 10^4$ Да); 4 — овалбумин ($M = 4.5 \cdot 10^4$ Да); 5 — карбоангидраза ($2.9 \cdot 10^4$ Да); 6 — цитохром С ($1.25 \cdot 10^4$ Да); 7 — глицин.

Особый интерес представляет применение микроэсклюзионной хроматографии для анализа ММР полярных полимеров: полиэфиров, полиамидов, поскольку для этого в качестве элюентов требуются высокотоксичные перфторированные кислоты или спирты. На рис. 11 и 12 приведены эксклюзионные хроматограммы лавсановых (полиэтилентерефталатных) и капроновых (полиамидных) волокон, полученные на жидкостном хроматографе ХЖ1309 с использованием одной капли растворителя (≈ 70

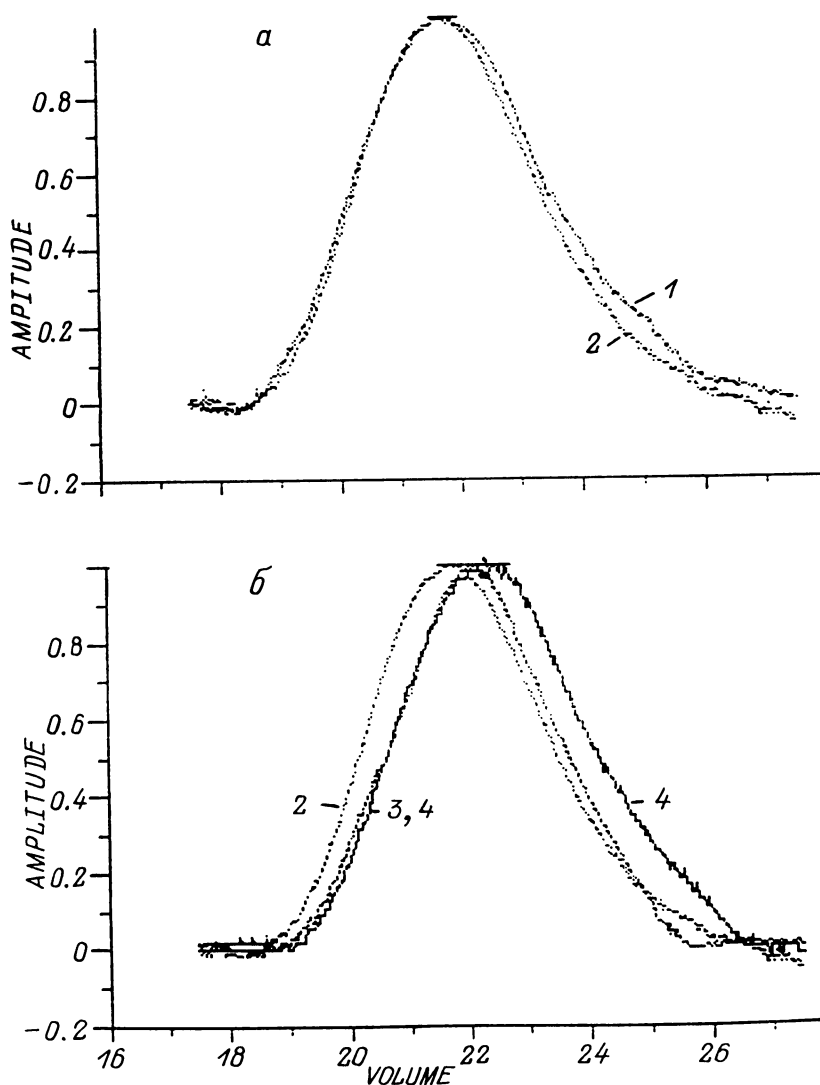


Рис. 11. Сравнение эксклюзионных хроматограмм волокон капроновых веревок, полученных на ХИ1309 в гексафторизопропанолем с трифторацетатом натрия. Колонка со смесью силикагелей „Nucleosil“ 5 мкм, 0.5×350 мм, скорость элюции 2.5 мкл/мин: а) с места преступления (труп, пролежавший в воде полгода — (1); с найденной у подозреваемого — (2); б) образца (1) с образцами из коллекции (3, 4)

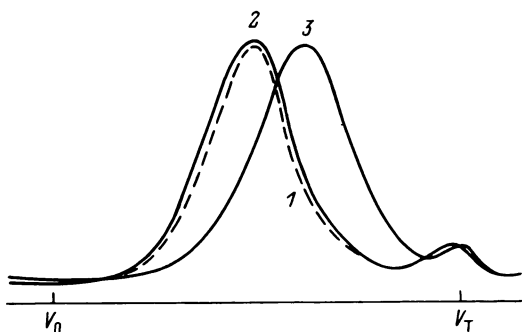


Рис. 12. Эксклюзионные хроматограммы лавсановых волокон, полученные на ХЖ1309 в трифторуксусной кислоте. Колонка со смесью силикагелей „Nucleosil“ 5 мкм, 0.5×350 мм, скорость элюции 3 мкл/мин. 1 — волокно рубашки (7 мкг), найденное на месте преступления; 2 и 3 — образцы, идентифицируемые с 1

мкл). Эти образцы представляют вещественные доказательства криминалистической экспертизы для установления идентичности лавсановых и капроновых волокон, обнаруженных на месте преступления и найденных при обыске у подозреваемых лиц. Уникальность ММР каждой партии полимеров, полученной в определенном полимерном реакторе, позволяет использовать ММР как ее фингерпринт.

Заключение

Оптимизация гидравлической системы микроколоночного хроматографа, разработка высокочувствительного интерференционно-поляризационного детектора с измерительной ячейкой объемом 0.1 мкл и фторопластовых колонок для эксклюзионной хроматографии с эффективностью до 20000 т.т., специальной системы расчета ММР с коррекцией приборного уширения позволило создать в НТО АН СССР коммерческий микро-гель-хроматограф, успешно апробированный в анализе полимеров и белка. Этот хроматограф имеет уникальную по сравнению с гель-хроматографами, снабженными колонками обычного диаметра, область применения: анализ ММР полярных синтетических полимеров, для элюции которых используются высокотоксичные перфторированные кислоты и спирты.

Перспективы дальнейшего развития микро-гель-хроматографа для эксклюзионной хроматографии связаны с заменой хроматографических колонок из фторопласта колонками из гибких кварцевых капилляров $d_c = 0.2$ мм, поскольку подобные колонки обладают серьезными преимуществами (см. таблицу и [16]). Они имеют (а) меньшее гидравлическое сопротивление ($k_0 =$

= 0.0025 вместо $k_0 = 0.001$ у обычных колонок); (б) меньшую приведенную оптимальную скорость, $v = 1.5$; (в) хорошие возможности детектирования („on column“, „in column“); (г) высокочувствительное детектирование хроматографических пиков с большими k' („in column“); (д) хорошую воспроизводимость времени удерживания, t_R и ширины пика, σ_t ; (е) химическую инертность; (ж) низкую чувствительность эффективности колонки, N к дефектам упаковки; (з) возможность поддержания высокой эффективности путем периодического удаления верхней части колонки, и обеспечивают (и) экономию сорбента и растворителей („однокпельная хроматография“), возможность (к) получения длинных $L = 1$ м высокоэффективных колонок с приведенной ВЭТТ ($h = 2$); (л) имеют меньшие потери вещества за счет уменьшения сорбции и увеличения рабочей концентрации элюата и имеют (м) низкую стоимость. Большая часть этих достоинств капиллярных колонок играет важную роль в эксклюзивной хроматографии. Максимальный диаметр капиллярных колонок $d_c = 200$ мкм [16] определяется из требования к их термостатированию. Определим максимальный объем измерительной ячейки детектора V_d (соответствующий объему пробы V_s), который не ухудшает более чем на 10 % эффективность хроматографической колонки $d_c = 200$ мкм, заполненной сорбентом $dp = 3$ мкм, при эффективности $N = 2 \cdot 10^4$ и пористости $\epsilon = 0.7$, приведенная ВЭТТ которой $h_{\min} = 2$. Воспользуемся для этого известным соотношением [16]

$$V_d \approx V_s \leq 0.5 \sigma_V^{\circ} \quad (k' = 0)$$

Учитывая, что $\sigma_V^{\circ} = (\pi \epsilon / 4) N^{1/2} h d p d c^2$, получаем $V_d = 0.033$ мкл, что, как указано выше, вполне отвечает возможности миниатюризации интерференционно-поляризационного рефрактометрического детектора. Отметим, что с увеличением N и dp требования к миниатюризации измерительной ячейки детектора и дозатора снижаются.

Переход к кварцевым капиллярным колонкам существенно улучшает параметры гель-хроматографа. Если обратиться к фундаментальному гидродинамическому уравнению хроматографии [16]

$$(\Delta P)^2_{opt} = \left[\frac{h_{\min} v_{opt}}{k_0} \right] (D_m \eta) N,$$

где ΔP — давление на входе в колонку, D_m — коэффициент диффузии, η — коэффициент вязкости, то видно, что переход к гибким кварцевым капиллярным колонкам, у которых v_{opt} в

два раза меньше, а k_0 в 2.5 раза больше, чем при обычной хроматографии, $(dP^2 \Delta P)_{opt}$ снижается в 5 раз по сравнению с обычными колонками при сохранении условий хроматографического анализа (D_m , η , N). А это в свою очередь позволяет при заданном ΔP уменьшить $d_{P_{opt}}$ в $\sqrt{5} = 2.2$ раза, уменьшить в то же число раз длину колонки ($L = NhdP$) и в 2.5 раза сократить время анализа, поскольку согласно [16]

$$t_R = \frac{NdP^2}{D_m} \left(\frac{h}{v} \right) (1 + K).$$

Таким образом, переход к гибким кварцевым капиллярным колонкам помимо улучшения характеристик колонок (стабильности, возможности приготовления высокоэффективных колонок с большой N , сокращения объема сорбента и элюента) позволяет уменьшить за счет снижения dP длину колонки и время анализа, а за счет возможности капиллярных колонок к повышению давления значительно увеличить их N , что особенно важно при анализе олигомеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Micropcolumn High-Performance Liquid Chromatography*, ed. P. Kucera. Amsterdam. 1984.
2. *Microcolumn Separations: Columns, Instrumentations and Ancillary Techniques*, ed. M.V. Novothy, D. Ishii, Amsterdam. 1985.
3. *Small Bore Liquid Chromatography Columns: Their Properties and Uses*, ed. R.P.W. Scott, N.Y., 1984.
4. *Belenkii B.G., Gankina E.S., Maltsev V.G. Capillary liquid Chromatography*. N.Y., London, 1987.
5. *Jinno K., Nishibara M. // Anal. Lett.* 13, 673 (1980).
6. *Кевер Е.Е., Ганкина Э.С., Беленький Б.Г. Высокомолекулярные соединения. — 1981. — А23, 234.*
7. *Kever J.J., Belenkii B.G., Gankina E.S., Vilenchik L.Z., Kurenbin O.I., Zhmakina T.P. // J. Chromatogr.* 207, 145 (1981).
8. *Kever J.J., Belenkii B.G., Gankina E.S., Vilenchik L.Z., Kurenbin O.I., Zhmakina T.P. // HRC & CC* 4, 425 (1981).
9. *Alexandrov M.L., Belenkii B.G., Gankina E.S., Gotlib V.A., Kever J.J., Komarov N.N., Pavlenko V.A. // HRC & CC* 6, 629 (1983).
10. *Кевер Е.Е., Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Виленчик Л.З., Куренбин О.И., Жмакина Т.П. // Высокомолекулярные соединения. — 1982. — В-24. — С. 403.*

11. Виленчик Л.З., Куренбин О.И., Жмакина Т.П., Беленький Б.Г. // Высокомолекулярные соединения. — 1980. — А-22. — С. 2801.
12. Виленчик Л.З., Куренбин О.И., Жмакина Т.П., Нестеров В.В., Чубарова Е.В., Беленький Б.Г. // Высокомолекулярные соединения. — 1980. — А-22. — С. 2804.
13. Ishii D., Takeuchi T. // J. Chromatogr. 255, 349 (1983).
14. Takeuchi T., Ishii D., Mori S. // J. Chromatogr. 257, 327 (1983).
15. Kennedy R.T., Vorgenson Y.W. // J. microcolumn Sep. 2, 120 (1990).
16. Беленький Б.Г. // Журнал аналитической химии. — 1990. — Вып. 45. — С. 643.
17. Беленький Б.Г., Белло М.С., Кевер Е.Е., Королева Е.М. Проблемы микроколонной высокоэффективной жидкостной хроматографии / В кн.: Синтез, структура и свойства полимеров. — Л., Наука, 1989. — С. 253.
18. Europäische patentanmeldung 85903448.0 03.06.87 Patentblatt 8/23.
19. J. Jamin. *Comp. Rend. Acad. Sci. Paris* v. 67 814 (1968).
20. Молочников Б.И. // ИКА. № 7-8 (29-30), 3 (1980).
21. Hagel L. // *Anal. Chem.* 50, 589 (1978).
22. Lebesque H.J.M., Blaise B.S. // *Optic.* B21, 574-579 (1964).
23. Matura K., Horita M., Yamamoto G., Hattori S. // *Optics and Laser Technology*, 9, 285 (1977).