



1

ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ СО АН СССР

Г.И.Барам, Ю.А.Болванов, М.А.Грачев,
В.В.Каргальцев, Н.И.Комарова,
С.В.Кузьмин, Э.А.Купер, М.П.Перельройзен

МИКРОКОЛОНОЧНАЯ ЖИДКОСТНАЯ
ХРОМАТОГРАФИЯ С МНОГОВОЛНОВОЙ
ФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ.
МИКРОКОЛОНОЧНЫЙ ЖИДКОСТНЫЙ
ХРОМАТОГРАФ "ОБЬ-4"

ПРЕПРИНТ 83-90



НОВОСИБИРСК

Г.И.Барам^{ж)}, Ю.А.Болванов^{жж)}, М.А.Грачев^{ж)},
В.В.Каргальцев, Н.И.Комарова^{ж)}, С.В.Кузьмин^{жж)},
Э.А.Купер, М.П.Перельройзен^{ж)}

МИКРОКОЛОНОЧНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ С МНОГОВОЛНОВОЙ
ФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ. МИКРОКОЛОНОЧНЫЙ ЖИДКОСТНЫЙ
ХРОМАТОГРАФ "ОБЬ-4".

А Н Н О Т А Ц И Я

Микроколоночный жидкостный хроматограф "Обь-4" предназначен для высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонках характерного объема 50-200 мкл с объемом элюента 500-2500 мкл. Детектором прибора служит двухлучевой микроспектрофотометр с проточными плоскопараллельными кюветами, снабженный специальным устройством для быстрой смены длин волн по циклической программе в диапазоне 190-360 нм с шагом 10 нм. Благодаря возможности быстрой смены длины волны фотометрическую детекцию можно проводить при нескольких длинах волн в режиме разделения времени.

С помощью хроматографа можно проводить все виды высокоэффективной жидкостной хроматографии, причем обеспечивается значительная экономия анализируемых веществ, растворителей и сорбентов. Использование многоволнового режима упрощает идентификацию хроматографических пиков и оценку гомогенности разделенных веществ.

^{ж)} Новосибирский институт органической химии СО АН СССР.

^{жж)} Специальное конструкторско-технологическое бюро специальной электроники и аналитического приборостроения СО АН СССР.

I. Введение

В Сибирском отделении Академии наук СССР в течение ряда лет развиваются разработки по микроколоночной жидкостной хроматографии. Сандахчиев и сотр. еще в 1969 г. [1] разработали методики жидкостной хроматографии на колонках объемом 1 мкл с объемом элюента 3-20 мкл для изократической и градиентной элюции. В качестве фотометрической кюветы с эффективным объемом около 0,01 мкл использовалась нижняя часть самой хроматографической колонки за фильтром. Колонка изготовлялась из стекла, прозрачного для УФ-света. Детекцию осуществляли с помощью специально разработанного двухлучевого микроспектрофотометра.

Значительно позднее аналогичная техника была описана японскими исследователями [2].

Использование цилиндрической, освещаемой сбоку кюветы не совершенной с оптической точки зрения формы затрудняет проведение спектральных измерений. На результатах сильно сказывается изменение показателя преломления элюата. Однако, основное затруднение в использовании предложенной в работе [1] техники состояло в том, что она была непривычной и не вполне удобной для работы в обычной аналитической лаборатории, требуя манипулирования микрообъектами и микрообъемами жидкостей под микроскопическим контролем. Тем не менее, выявленные в этой работе выдающиеся преимущества микроколоночной хроматографии — большая скорость анализа, экономия анализируемых веществ, элюентов и сорбентов, улучшение отношения сигнал/шум благодаря повышению детектируемых концентраций — стимулировали разработки, направленные на использование метода в рутинном анализе.

Для решения этой задачи был разработан новый детектор — двухлучевой микроспектрофотометр с проточной плоскопараллельной кюветой объемом 2 мкл [3,4]. Была разработана также техника микроколоночной хроматографии в водных растворах с характерным объемом колонок для ионообменной хроматографии 50 мкл и объемом элюента 500-1000 мкл [5,6]. Эта техника получила распространение в ряде областей (см., например, сс. [5-9]). Одним из важных преимуществ описанного в работах [3,4] детектора было то обстоятельство, что он позволял проводить регистрацию поглощения элюата в условиях непрерывной смены трех-шести длин волн

по циклической программе, т.е. проводить многоволновую фотометрическую детекцию в режиме разделения времени.

В течение последовавших нескольких лет наша группа вела приборные и методические разработки, направленные на усовершенствование аппаратуры и техники микроколоночной жидкостной хроматографии и на создание такого микроколоночного жидкостного хроматографа, который был бы пригоден для промышленного производства и широкого использования. При этом преследовались следующие цели:

1. Расширение динамического диапазона, повышение точности, чувствительности и быстродействия детектора.

2. Создание комплектного микроколоночного хроматографа, содержащего наряду с детектором все другие необходимые устройства - микронасос, устройство для ввода образцов, колонки разных типов, коллектор фракций - для анализов с типичным объемом элюента 500-2500 мкл и объемом колонки порядка 200 мкл.

3. Разработка методик высокоэффективной микроколоночной жидкостной хроматографии с многоволновой детекцией для соединений разных классов.

Итогом разработок является микроколоночный жидкостный хроматограф "Обь-4", конструкция и некоторые аналитические возможности которого описаны ниже.

2. Конструкция хроматографа

2.1. Общая компоновка.

На фотографии (рис.1) показан внешний вид прибора "Обь-4". Прибор состоит из следующих блоков: 1 - электронный измерительный и управляющий блок; 2 - оптико-механический блок; 3 - микронасос; 4 - устройство ввода пробы и хроматографическая колонка; 5 - коллектор фракций.

Все органы управления прибором размещены на передней панели электронного блока. Правая часть панели обслуживает детектор. С помощью наборного поля 6 может быть выбрана циклическая программа длин волн в интервале 190-360 нм с шагом 10 нм, либо установлена любая длина волны в этом интервале с шагом 2 нм,

либо задан интервал, на котором будет снят УФ-спектр с шагом 2 нм. С помощью рукоятки 7 время измерения при одной длине волны может быть выбрано равным от 0,15 до 20 сек. С помощью рукоятки 8 пределы измерения оптической плотности при выводе данных на самописец могут быть выбраны равными 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,80; 1,60; 3,20; 6,40; 12,8 (в расчете на 1 см оптического пути). Кнопка 9 служит для "скадывания шкалы", о котором будет сказано ниже. На правой части светового табло 10 высвечивается длина волны, в середине - значение оптической плотности в расчете на 1 см оптического пути.

Левая часть панели электронного блока обслуживает жидкостную систему хроматографа. С помощью рукоятки 11 можно установить скорость подачи растворителя (или его набора) 600; 200; 100; 50; 30; 20; 15; 10; 5; 2 мкл/мин; имеется также возможность быстрой промывки. С помощью клавиатуры 12 можно установить направление движения поршня и объем, после набора или вытеснения которого насос остановится. Этот объем может быть выбран в интервале от 0,1 до 2500 мкл. Объем индицируется на левой части светового табло 10. С помощью рукоятки 13 может быть выбран объем фракций, собираемых коллектором, в интервале от 5 до 50 мкл.

Микронасос снабжен индикатором давления 14 и устройством, которое подает звуковой сигнал при остановке поршня в крайних положениях или при превышении давления 5 МПа.

Верхняя крышка электронного блока выполнена из инертного пластика. Габаритные размеры хроматографа 70x50x30 см, вес 42 кг.

2.2. Детектор

Оптическая схема двухлучевого микроспектрофотометра - детектора хроматографа "Обь-4" - показана на рис.2. Монохроматор построен на основе голографической дифракционной решетки 3600 штр/мм. Решетка при смене длины волны поворачивается с помощью шагового двигателя и специального синусного механизма (рис.2а), состоящего из гибкой стальной ленты и кольца, эксцентрически закрепленного на ведомом валу [10]. Двухлучевая фотометрическая схема (рис.2с) представляет собой зеркальный микробиообъектив, выпуклое зеркало которого с помощью элек-

тромагнитного привода может устанавливаться в двух положениях и, благодаря этому направлять свет попеременно в кювету образца и сравнения.

Блок кювет (рис.3) представляет собой прокладку из фторопласта с выполненными в ней двумя отверстиями, по которым проходит свет; одно из этих отверстий - кювета образца, второе - кювета сравнения. Отверстия закрываются общими для кювет плоскими кварцевыми стеклами. Элват подводится к кювете по тонким капиллярам по схеме, близкой к Z-образной.

Электронная измерительная схема микроспектрофотометра представляет собой логарифмирующий интегрирующий цифровой вольтметр, принцип действия которого основан на экспоненциальном законе разряда емкости через резистор. Цикл одного измерения составляет 160 мсек (8 периодов сети). Световой поток, проходящий через канал сравнения, преобразуется фотоумножителем в электрический ток. Этот ток интегрируется в течение 40 мсек интегратором, состоящим из емкости и усилителя с большим коэффициентом усиления. После отключения интегратора от фотоумножителя емкость замыкается на резистор и время ее разряда до определенного потенциала измеряется цифровым способом и записывается в регистр. После переключения светового канала аналогичным способом интегрируется ток в измерительном канале и затем емкость разряжается через тот же резистор до того же потенциала. Время разряда вычитается из времени разряда, записанного в регистре. Оставшаяся в регистре разность пропорциональна логарифму отношения фототоков каналов и, при условии, что фототок связан со световым потоком линейно, оптической плотности. Величина разности, помноженная на нормирующий коэффициент, высвечивается на табло. Кроме того, она через цифро-аналоговый преобразователь выдается на самописец. Кроме упомянутых действий, в течение цикла измерения происходит подстройка напряжения на фотоумножителе в соответствии с величиной светового потока, а также калибровка элементов измерительной схемы.

Для увеличения отношения сигнал/шум циклы измерения могут повторяться многократно (число повторов определяется положением рукоятки 7, рис.1), причем результат усредняется цифровым способом.

2.3. Микронасос

В хроматографе использован микронасос шприцевого типа с вытесняемым объемом цилиндра 2500 мкл. Цилиндром служит молибденовая стеклянная трубка диаметром 9 мм и толщиной стенки 2,5 мм. Поршень выполнен из тантала и снабжен фторопластовой прокладкой, которая с постоянным усилием прижимается к стенкам цилиндра под действием конуса и пружины. Поршень через винтовой механизм приводится в движение шаговым двигателем, который управляется электронным блоком. Насос снабжен датчиком давления, измеряющим усилие между торцом ходового винта и поршнем. С датчика сигнал, пропорциональный давлению, поступает на гальванометр-индикатор. Соединение поршня с ходовым винтом безлюфтовое. Насос позволяет развивать давление до 5 МПа.

2.4. Колонки и устройства ввода образца

Для проведения хроматографических разделений в различных растворителях хроматограф снабжен колонками и устройствами ввода образца двух типов. Колонки для ионообменной хроматографии в агрессивных средах выполнены из стеклянных трубок внутреннего диаметра 0,8 и длины 30-40 мм, в нижнюю часть которых перед оттянутым кончиком впаян стеклянный фильтр, а в верхней части имеется коническое расширение. Колонка вставляется в специальный держатель (рис.4а), с помощью которого к конусу прижимается полиэтиленовый патрубок; на нижней части патрубка путем нагревания в пламени сформирована полусфера. В выходной патрубок насоса в этом случае вставляется полая игла из нержавеющей стали (или стеклянный капилляр), плотно входящая в полиэтиленовый патрубок колонки. Подобное соединение выдерживает давления до 1,5 МПа. Жидкостная схема в этом варианте может использоваться с весьма агрессивными элюентами, например, с концентрированной HCl.

Колонки второго типа и устройство ввода (рис.4в) выполнены из нержавеющей стали и предназначены для работы с менее агрессивными элюентами, например, для адсорбционной и обращенно-фазовой хроматографии. В этом случае патрубок насоса соединяется с двухходовым краном, который обеспечивает постоянное сообщение насоса с иглой устройства ввода образца и перекрывает

мое сообщение с резервуаром для элюента (рис.4с). Показанная на рис.4в схема устройства ввода образца позволяет вводить образец в остановленном потоке. Проба забирается микронасосом в иглу путем перемещения поршня вниз на заданное расстояние в соответствии с набранной на клавиатуре величиной объема. Затем игла вводится в отверстие устройства ввода и герметизируется в нем путем поворота давящего на кольцевую фторопластовую прокладку винта, и по заданной программе происходит нанесение образца и элюция. К устройству ввода соединением типа Свейглок присоединена хроматографическая колонка, которая представляет собой набитую сорбентом трубку из нержавеющей стали диаметром 1-2 мм с полированными внутренними стенками. На обоих концах трубки помещены прижатые к торцам фильтры из пористой нержавеющей стали (толщина 0,1 мм, диаметр пор 2 мкм).

2.5. Коллектор фракций

Вытекающий из кюветы детектора элюат может быть разделен на фракции равного объема, величина которого задается с электронного блока. Эта задача выполняется с помощью микроколлектора. В качестве сборников служат лунки во фторопластовом кольце. Коллектор представляет собой электромагнитный храповый механизм, который при получении сигнала от электронного блока опускает фторопластовый диск, поворачивает его на 1/100 часть окружности и вновь поднимает. Благодаря тому, что подводный элюат капилляр касается дна лунки-сборника (рис.5), можно собирать фракции, объем которых меньше одной капли (например, по 5 мкл).

3. Обоснование конструкции и результаты испытаний

3.1. Выбор масштаба

Из простых физических соображений очевидно, что значительное уменьшение объемов хроматографических колонок и элюента при пропорциональном уменьшении диаметра частиц сорбентов и наносимой пробы не должно сказываться на результатах жидкостной хроматографии. Это и было подтверждено в работе [1], где масштаб жидкостной хроматографии был уменьшен по сравнению с обычным приблизительно в 10000 раз (хотя в то время не ставилась задача получения высокого хроматографического разрешения,

т.е. приготовления колонок с большим числом теоретических тарелок). В работе [11] были отмечены преимущества миниатюризации объемов. Во-первых, при миниатюризации повышение чувствительности анализа, т.е. снижение расхода анализируемого вещества, достигается без изменения его концентрации, благодаря чему требования к отсутствию примесей в элюенте остаются такими же, как и в макро-методе. Во-вторых, значительно снижается не только расход пробы, но и расход элюентов и сорбентов. В дополнение к этому можно добавить, что миниатюризация приводит к упрощению аппаратуры и снижению ее материалоемкости.

В начале разработки хроматографа "Обь-4" необходимо было задать коэффициент миниатюризации. Он был выбран из следующих соображений. Современные жидкостные хроматографы позволяют проводить разделение на колонках 1-5 мл с объемом элюента 10-50 мл, причем обычно используемые колонки имеют эффективность 3000 - 10000 теоретических тарелок. Однако, коммерчески доступные сорбенты с размером частиц 3-5 мкм можно упаковать в такие колонки, которые имеют указанную общую эффективность при объеме 200-500 мкл. Если принять такой масштаб за основу, то характерный расход элюента на один анализ составит 0,5-2 мл. При этом дисперсия для самых узких, неудерживаемых пиков будет составлять около 2 мкл, а объем наносимой пробы без ущерба для качества разделения может составлять 0,5-1 мкл (ср. сс. [12,13]). На основании этих данных и были выбраны объемы элементов жидкостной схемы хроматографа "Обь-4". Что же касается размеров кюветы, то ее оптимизацию нужно было проводить с учетом как гидродинамических, так и фотометрических характеристик.

3.2. Характеристики детектора

Детектор играет определяющую роль в работе хроматографа "Обь-4" и поэтому факторы, влияющие на его характеристики, будут рассмотрены подробно. В работе [3] были сформулированы условия достижения максимальной точности фотометрирования с помощью двухлучевых спектрофотометров, т.е. условия, при которых шум, дрейф и смещение нулевой линии при изменении рабочей длины волны минимальны, а отклик прибора на оптическую плотность линейен.

Временной дрейф нулевой линии в двухлучевом спектрофото-

метре объясняется нестабильностью положения светящегося тела источника света и неодинаковой чувствительностью различных участков фотокатода фотоприемника. Для того, чтобы временной дрейф нулевой линии был минимальным, оптическая схема должна удовлетворять следующим требованиям:

- один и тот же световой пучок должен поочередно направляться на рабочую кювету и кювету сравнения;
- при прохождении светового пучка через кювету он не должен задевать ее края;
- свет, проходящий через кювету сравнения и кювету образца, должен фокусироваться на одном и том же участке фотокатода фотоприемника.

При выполнении этих требований изменения в геометрии и интенсивности попадающего на кюветы светового потока и дрейф чувствительности различных участков фотокатода будут приводить к одинаковому изменению сигналов образца и сравнения и компенсируются при обработке этих сигналов электронной измерительной схемой.

Смещение нулевой линии при сканировании спектра объясняется различием спектральных характеристик оптических элементов, не являющихся общими для каналов образца и сравнения. Поэтому, чтобы свести к минимуму смещение нулевой линии при сканировании спектра, нужно свести к минимуму число таких не являющихся общими для каналов элементов.

Все перечисленные условия выполнены в двухлучевом спектрофотометре - детекторе хроматографа "Объ-4". Как видно из рис.2, использованный в приборе зеркальный объектив с поворачивающимся выпуклым зеркалом поочередно направляет один и тот же световой поток на кюветы образца и сравнения, причем при переключении каналов пятно света на фотоумножителе не смещается. Объектив фокусирует свет на кюветах так, что он не задевает края кювет. Элементы, не являющиеся общими для каналов образца и сравнения, это только сами кюветы. Благодаря этим решениям схема раздвоения луча обеспечивает недостижимую при других конструкциях идентичность спектральных характеристик каналов образца и сравнения - при переключении каналов происходит лишь небольшое смещение светового пятна на поверхности вогнутого зеркала. Различные участки этого зеркала, естественно, имеют весьма сходные между

собой спектральные характеристики.

При выборе оптимального соотношения диаметра и длины кюветы при заданном ее объеме необходимо учитывать, что при увеличении длины кюветы световой поток, который может быть направлен в кювету, уменьшается настолько быстро, что рост шума, связанного с недостатком света, опережает рост полезного сигнала. Т.о., для увеличения отношения сигнал/шум при заданном объеме кюветы нужно не увеличивать длину ее оптического пути, как это подсказывает интуиция, а уменьшать ее.

Кюветы небольшой толщины имеют преимущество еще и потому, что их применение расширяет концентрационный динамический диапазон детекции, поскольку точное измерение малых оптических плотностей осуществляется значительно проще, чем достижение линейности при измерении больших оптических плотностей ($A > 3$).

Однако, кювету необходимо оптимизировать не только по фотометрическим, но и по гидродинамическим характеристикам. Очевидно, что при одинаковом объеме лучшими гидродинамическими характеристиками будут обладать длинные узкие кюветы. В работах [12,13] рассмотрена теория протекания элюатов через фотометрические кюветы и сформулированы требования, при выполнении которых размывание хроматографических зон в кюветах не вносит существенного вклада в общую дисперсию хроматографических пиков. К сожалению, приведенные в этих работах формулы не могут быть прямо использованы для кювет прибора "Объ-4", т.к. они выведены в предположении, что световой поток проходит через все сечение кюветы.

В связи с этим геометрия кювет прибора "Объ-4" была выбрана эмпирически, путем сравнения характеристик кювет разных объемов и форм. Наилучшие результаты были получены с кюветой

Z-образной формы с тангенциально расположенными вводом и выводом. Внутренний диаметр подводящих капилляров 0,1 мм, их длина - менее 25 мм. Диаметр кюветы 1,2 мм, длина оптического пути 1,6 мм. Для проверки динамических характеристик в заполненную растворителем кювету через подводящий капилляр вводили малый объем (0,1 мкл) поглощающего УФ-свет раствора и промывали ее растворителем с помощью микронасоса при различных скоростях. Полученные результаты показаны на рис.6. Расчеты показали, что при полученной гидродинамической характеристике и значениях

коэффициентов уширения зон (увеличение δ на 10%), рассматриваемых в работах I2, I3 как допустимые, выбранные кюветы приемлемы для работы с колонками, имеющими эффективность до 10000 теоретических тарелок и объем 500 мкл.

К монохроматору детектора, предназначенного для регистрации поглощения элюата при нескольких длинах волн в режиме разделения времени, также предъявляются специфические требования. Прежде всего, нужно, чтобы монохроматор давал достаточно интенсивный световой поток для обеспечения высокого отношения сигнал/шум при быстрой регистрации. Для выполнения этого требования приходится идти на компромисс со спектральным разрешением и увеличивать спектральную щель, полуширина которой в детекторе прибора "Обь-4" равна 5 нм. Такая ширина не искажает спектры подавляющего большинства исследуемых методом жидкостной хроматографии веществ, т.к. в растворах тонкая структура УФ-спектров сглаживается. В необходимых случаях, например, при работе с полиароматическими соединениями, имеющими спектры с тонкой структурой, для сравнения полученных на приборе "Обь-4" данных с опубликованными спектрами последние нужно расчетным путем преобразовывать к разрешению 5 нм.

Исходя из аналогичных соображений о необходимом спектральном разрешении был выбран также шаг изменения длины волны, равный 2 нм в режиме измерения спектра в остановленном потоке и 10 нм в режиме многоволновой детекции. Использование более мелкого шага, типичного для многих известных детекторов, из-за гладкости спектров давало бы ненужную избыточную информацию и приводило бы к неоправданному усложнению конструкции.

Далее следовало выбрать оптимальный диапазон длин волн. В детекторе прибора "Обь-4" это 190-360 нм. Коротковолновое крыло диапазона важно для детекции многих классов соединений неароматического характера, таких, как карбоновые кислоты, пептиды, альдегиды и кетоны, углеводы и др. Вместе с тем, по нашему мнению, отсутствие видимой части спектра не суживает область применения детектора, т.к. все поглощающие видимый свет вещества имеют и характерное поглощение в УФ-диапазоне. Расширение спектрального диапазона прибора "Обь-4" на видимую область привело бы к увеличению размеров спектрофотометрического детектора и привело бы к значительному усложнению конструкции,

в частности, пришлось бы снабжать прибор двумя источниками света.

Решающее значение при многоволновой детекции приобретает скорость смены длины волны, точность и воспроизводимость ее установки. Поскольку время выхода пика при высокоэффективной жидкостной хроматографии может составлять несколько секунд, быстродействие монохроматора должно быть высоким - за время выхода пика циклическая программа, состоящая, например, из трех длин волн, должна быть повторена 8-10 раз, т.е. одно измерение при одной длине волны должно производиться за время порядка десятых долей секунды. Высокая точность установки длины волны нужна для того, чтобы иметь возможность сравнивать полученные значения спектральных отношений с опубликованными данными. Еще более высокие требования предъявляются к воспроизводимости установки длины волны. Если воспроизводимость будет недостаточна, то при длинах волн, приходящихся на участки крутого подъема или спада УФ-спектров, в режиме многоволновой детекции будет наблюдаться большой шум.

Указанные проблемы нашли свое разрешение в конструкции спектрофотометрического детектора хроматографа "Обь-4". Быстродействие, достигнутое благодаря применению синусного механизма (рис.2а), позволяет проводить измерение при одной длине волны в многоволновом режиме за 0,2 сек. Точность установки длины волны, определяемая путем измерения спектра хромат-иона, составляет $\pm 0,5$ нм. Воспроизводимость установки длины волны, оцененная по воспроизводимости измерения оптической плотности на участке крутого спада УФ-спектра в многоволновом режиме, лучше, чем $\pm 0,01$ нм.

Результаты исследования некоторых характеристик детектора прибора "Обь-4" показаны на рис.7. В дополнение к этим данным нужно отметить, что временной дрейф нулевой линии детектора не удалось наблюдать доступными нам средствами даже за весьма длительные интервалы времени. Эти опыты проводились с имитатором кюветы, который представлял собой пластину с двумя отверстиями той же конфигурации, что и кюветы. Дрейф нулевой линии, наблюдаемый с реальной кюветой, всегда имеет химическую природу - он связан с изменением состава находящегося в кювете раствора.

Метрологическая характеристика детектора хроматографа "Обь-4" как средства измерения оптической плотности (т.е. спектрофотометра) представляет собой сложную задачу, которая к настоящему времени полностью не решена из-за отсутствия эталонных средств необходимой высокой точности. Очевидно, что при использовании спектрофотометра в качестве детектора для жидкостной хроматографии наибольшее значение имеет не абсолютная точность измерения оптической плотности, а линейность отклика в большом диапазоне концентраций детектируемых веществ. Линейность отклика во всем динамическом диапазоне важна не только (и не столько) для правильного определения площади хроматографических пиков, но и для правильного вычисления спектральных отношений.

Линейность отклика спектрофотометра на оптическую плотность определяется тремя факторами – во-первых, качеством монохроматора и соотношением полезного и рассеянного световых потоков; во-вторых, линейностью отклика фотоприемника (фотомножителя), т.е. прямой пропорциональностью между даваемым им фототоком и величиной освещающего фотокатод светового потока; в-третьих, качеством обработки сигнала, т.е. той точностью, с которой электронная измерительная схема преобразует фототоки образца и сравнения в логарифм отношения этих фототоков.

При разработке детектора "Обь-4" последняя из этих трех задач была решена с некоторой избыточностью. Как установлено специальными электрическими измерениями, линейность зависимости показаний электронного измерительного блока от величины логарифма отношения двух эталонных электрических токов выдерживается с точностью, лучшей чем $\pm 0,1\%$ на диапазонах измерения оптической плотности (в упомянутых выше концентрационных единицах) от 0 до 6,4, и с точностью, лучшей, чем $\pm 0,5\%$ в диапазоне до 12,8. Эти величины соответствуют логарифму отношения фототоков от 0 до 2.

Линейность отклика детектора на оптическую плотность проверяли по растворам. В одном из опытов в качестве образцового раствора был взят раствор хромата калия [14]. Из приготовленного концентрированного раствора этого вещества готовили серию разведений, определяя коэффициент разведения путем взвешивания (а не измерения объемов). Результаты оценки линейности показаны на рис.8. Судя по этим данным, линейность отклика в диапа-

зоне от 0 до 8 ед. оптической плотности на 1 см не хуже $\pm 1\%$.

Как указывалось выше, линейность отклика при многоволновой детекции важна для правильной оценки спектральных отношений. В связи с этим был поставлен еще один эксперимент, в котором в качестве поглощающего УФ-свет раствора был взят водный раствор уридина. Концентрированный раствор уридина разводили, прокачивали через кювету и вычисляли спектральные отношения A_{λ}/A_{260} . Результаты показаны на рис.9. Судя по этим данным, также можно заключить, что линейность отклика на оптическую плотность лучше, чем $\pm 1\%$.

К сожалению, работа с растворами мало пригодна для метрологической оценки прибора с более высокой точностью. Источники возможных ошибок – это вероятные отклонения от закона Ламберта-Бера из-за усиления взаимодействия хромофорных молекул при росте концентрации растворенного вещества, наличие пыли в растворах, возможность изменения растворов при старении и действии УФ-света, а также адсорбции растворенных веществ на стенках кюветы и др. Более исчерпывающая метрологическая характеристика линейности будет предметом отдельного исследования. Что касается точности абсолютного измерения оптической плотности, то она, помимо обсужденной выше линейности, а также монохроматичности излучения, определяется точностью изготовления кюветы – длиной ее оптического пути. Эта точность сравнительно невысока ($\pm 5\%$), но увеличивать ее мы не считаем целесообразным, т.к. в этом нет необходимости при использовании спектрофотометра в качестве детектора при жидкостной хроматографии.

3.3. Характеристики насоса

Для оценки жидкостного хроматографа, помимо обсужденных выше характеристик детектора, важны и характеристики насоса. Как известно, в высокоэффективной жидкостной хроматографии в настоящее время применяются главным образом насосы непрерывного действия. Для снижения пульсаций такие насосы снабжают специальными механическими и электронными устройствами. Преимуществом насосов непрерывного действия является легкость их промывки и постоянная готовность к работе при серийных анализах.

Однако конструирование неппульсирующего насоса непрерывного действия для микроколоночной хроматографии со скоростью по-

дачи в интервале 2–1000 мкл/мин представляет собой непростую задачу из-за трудности изготовления прецизионных миниатюрных клапанных или золотниковых механизмов, особенно в коррозионно-стойком исполнении. В связи с этими затруднениями при разработке хроматографа "Обь-4" мы остановились на насосе шприцевого типа, в котором поршень в течение всего времени подачи элюента на колонку движется в одном направлении. При заданном небольшом объеме (2500 мкл) и умеренном давлении (5 МПа) цилиндр подобного насоса может быть выполнен из стекла, что позволяет следить за его чистотой и отсутствием пузырьков воздуха, а также обеспечивает высокую коррозионную стойкость. Использованная моллированная трубка из химически стойкого стекла наружного диаметра 14 мм и внутреннего 9 мм выдерживает давления до 10 МПа. Ее диаметр выдержан с точностью ± 10 мкм.

Привод насоса построен на основе прецизионного шагового двигателя (200 шагов на 1 оборот). Редуктор состоит из одной пары шестерен с безлюфтовым зацеплением и винтовой пары с прецизионным микровинтом. Привод позволяет достигнуть с поршнем площадью 60 мм^2 давления до 10 МПа, т.е. в два раза выше рабочего. Один шаг двигателя соответствует вытесняемому объему 0,05 мкл. Высокая точность механизма привода позволяет использовать насос не только для подачи элюента: но и для дозирования образца. Воспроизводимость дозирования образца объемом 2 мкл, как было выяснено в хроматографических экспериментах, составляет $\pm 2\%$ (рис.10). Правильность дозирования объемов оценивалась путем вытеснения номинального объема воды 100 мкл на различных участках хода поршня и взвешивания. Оказалось, что вытесненный объем соответствует номинальному в пределах $\pm 0,3\%$.

Для обеспечения возможности быстрой смены растворителя головка насоса может легко отсоединяться от привода для ручной промывки.

С помощью насоса можно проводить не только изократическую, но и градиентную элюцию. Эта возможность основана на том, что удельный вес компонентов градиента всегда несколько различается. Градиент готовится в цилиндре насоса. Например, при необходимости использовать линейный градиент концентрации NaCl от 0 до 0,3 М общего объема 2200 мкл из начального и конечного растворов готовят в небольших емкостях девять растворов, в ко-

торых начальный и конечный растворы смешаны в отношении 9:1; 8:2, ... 1:9. Насос заполняют 0,3 М NaCl и переводят поршень в положение полного вытеснения. Затем в насос набирают последовательно 200 мкл 0,3 М NaCl ; раствора, разбавленного в отношении 9:1; раствора, разбавленного в отношении 8:2 и т.д., кончая 200 мкл воды. Благодаря размыванию в шланге насоса в цилиндре создается не ступенчатый, а сглаженный градиент, форма которого близка к линейной. Далее насосом набирают пробу, соединяют шланг с колонкой и осуществляют подачу пробы, а затем (без перерыва) элюента. Небольшая разница удельных весов предотвращает конвекционное искажение градиента в насосе. Что же касается диффузионного размывания, из-за малой величины его можно не принимать во внимание. Как показали опыты с окрашенными растворами, градиент остается практически неизменным в течение часов.

Таким образом, можно готовить не только линейные градиенты, но и монотонные градиенты любой формы. Можно также при соответствующем учете удельных весов готовить не только двух-, но и трехкомпонентные градиенты.

Если удельный вес элюента при подаче градиента на колонку должен не возрастать, а убывать (как это имеет место, например, при обращенно-фазовой хроматографии), насос необходимо устанавливать в перевернутом положении. Для этого он снабжен штативом.

Исследования показали, что указанный способ градиентной элюции дает весьма воспроизводимые результаты. Воспроизводимость приготовления градиента иллюстрируется рис.11. Нужно отметить, что подобный способ давно практикуется при градиентном ультрацентрифугировании.

4. Примеры хроматографических разделений

4.1. Хроматография на высокоселективных сорбентах.

Как указывалось выше, на приборе "Обь-4" можно проводить разделения в сильно агрессивных средах. Примером такого разделения является хроматография ароматических аминов на катионите Дауэкс-50 в градиенте концентрации HCl (рис.12). На этом

же рисунке показан принцип регистрации данных многоволновой детекции. Хорошее разделение в этой системе достигается благодаря высокой селективности [15].

Рис.13 иллюстрирует использование хроматографа "Обь-4" для анализа качества коммерческого препарата аденозин-5'-трифосфорной кислоты. Это разделение выполнено на сорбенте, который обычно не используется в высокоэффективной жидкостной хроматографии, но весьма популярен в биохимии - на ДЭАЭ -целлюлозе. Благодаря тому, что высота колонки мала (30 мм), разделение можно провести достаточно быстро (20 мин). Этот же рисунок иллюстрирует упомянутую выше возможность "складывания шкалы". При выходе сигнала за пределы выбранной шкалы, в зависимости от положения кнопки "зашкал" (кнопка 9, рис.1) перо самописца либо остается в крайнем верхнем положении, либо возвращается в нижнее положение и продолжает регистрацию за вычетом одной полной шкалы. Первый режим удобен при многоволновой записи зашкаливающих пиков, т.к. запись легче интерпретировать. Второй режим предназначен для определения относительного содержания примесей. В данном случае примесь АМР составила 2,5%, а АДР - 2,0%. Этот результат легко получается из высот соответствующих пиков, причем для нахождения высоты главного пика нужно сосчитать число вложений. Минимальная примесь, которую можно измерить таким образом, составляет 0,05%.

Еще одним примером использования высокоселективной колонки является быстрое разделение АМР, АДР и АТР на силикагеле с привитым полиэтиленмином (рис.14). Это разделение проведено за 1,5 мин при давлении менее 1 МПа.

4.2. Высокоэффективная хроматография

Высокоэффективная хроматография проводилась на стальных колонках диаметром 2 и высотой 62 мм, набитых сорбентами с диаметром частиц 5 мкм. Колонки набивали суспензионным методом при давлении 25 МПа. К настоящему времени разработан ряд методик разделения для различных областей науки и практики. Эти методики будут служить предметом отдельных сообщений. Приведенные ниже примеры служат лишь для иллюстрации эффективности разделения и преимуществ многоволнового режима детекции.

На рис.15 показано разделение модельной смеси нитроанилинов на колонке с силикагелем. Можно видеть, что разделение занимает 4 мин., а эффективность составляет приблизительно 4000 теоретических тарелок. Разделение той же смеси, приведенное на рис.16, представляет собой результат детекции в сильно поглощающем элюенте. Оптическая плотность элюента в данном опыте - более 10 в пересчете на кювету 1 см. Это разделение иллюстрирует возможность работы далеко за "границей прозрачности" растворителей, установленной для обычных детекторов. Эта система и колонка нашли применение для анализа многих практически важных смесей, в основном полупродуктов органического синтеза.

Насыщением силикагелевой колонки медноаммиачным раствором может быть получена высокоэффективная лигандообменная колонка для хроматографии аминокислот, пептидов и других соединений аминной природы [16]. На рис.17 показан пример разделения на такого рода колонке смеси аминокислот. Можно видеть, что эффективность разделения достаточно высока. Особенно интересно, что разные аминокислоты (которые элируются, по-видимому, в виде медных комплексов) имеют разные спектральные отношения, что облегчает идентификацию.

На рис.18 показан результат обращенно-фазовой хроматографии некоторых ароматических углеводов. В этом случае использование многоволновой детекции тоже облегчает идентификацию.

Второй пример обращенно-фазовой хроматографии приведен на рис.19. Он иллюстрирует анализ сыворотки крови на содержание мочевой кислоты. В данном случае на колонку наносилось 10 мкл необработанной сыворотки крови человека. Благодаря использованному двухволновому режиму идентификация вещества опять-таки не вызывает никаких затруднений.

На рис.20 представлен результат обращенно-фазовой хроматографии смеси фенилтиогидантоиновых производных аминокислот. В обоих случаях (а и в) для анализа использованы примерно одинаковые количества аминокислот (100-200 рмоль). На рис.20а - хроматограмма, полученная с помощью "Обь-4", на рис.20в - результат высокоэффективной жидкостной хроматографии "нормального размера", полученный на серийном пептидном секвенаторе

(производства США). Сравнение этих хроматограмм позволяет сделать следующие выводы:

- разрешение, полученное на 200 мкл микро-колонке "Обь-4", мало отличается от разрешения, полученного на колонке "нормального размера";
- двухволновая детекция позволяет значительно повысить надежность идентификации некоторых аминокислот;
- расход растворителя у "Обь-4" в 15 раз меньше;
- благодаря тому, что при микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии исследуемое вещество подается на детектор в большей концентрации, химический "шум" (нестабильность нулевой линии) значительно ниже при работе с "Обь-4"; рис.20а демонстрирует гораздо больший запас по чувствительности.

Нам представляется, что приведенные в данном разделе примеры иллюстрируют возможность применения прибора "Обь-4" как высокоэффективного жидкостного хроматографа практически во всей области использования высокоэффективной жидкостной хроматографии. По сравнению с обычными приборами, хроматограф "Обь-4" обеспечивает:

1. Значительную экономию элюентов, сорбентов, анализируемых веществ.
2. Легкость идентификации веществ благодаря многоволновому режиму детектирования.
3. Расширение динамического диапазона детекции и легкость обнаружения микропримесей.

Л и т е р а т у р а :

- I. С.В.Кузьмин, В.В.Матвеев, Е.К.Прессман, Л.С.Сандахчиев. "Биохимия" 34 (1969), 706-711.
2. D.Ishii, K.Asai, K.Hibi, T.Jonokuchi, M.Nagaya "Journal of Chromatography" 144 (1977), 157 - 168.
3. С.В.Кузьмин. Двухлучевой спектрофотометр. Патент США № 3749497 (1973) и аналогичные в др. странах.
4. С.В.Кузьмин. В кн. под ред. Д.Г.Кнорре "Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот", "Наука", Москва, 1973, стр. 95-103.
5. В.В.Власов, М.А.Грачев, Н.И.Комарова, С.В.Кузьмин, Н.И.Мензорова. "Молекулярная биология", 6 (1972), 809-816.
6. М.А.Грачев. В кн. под ред. Д.Г.Кнорре "Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот", "Наука", Москва, 1973, стр. 104-122.
7. V.N.Ankilova, V.V.Vlassov, D.G.Knorre, N.V.Melamed, N.A. Nuzhdina FEBS Letters, 60 (1975), 166-171.
8. E.D.Sverdlov, G.S.Monastyrskaya, A.V.Chestukhin, E.D.Budovsky FEBS Letters, 33 (1973), 15 - 17.
9. M.A.Grachev in "Application of Biochemical Micromethods for Investigation of Tropical Disease Pathogens. Proceedings of a Course Held in Novosibirsk, 24 august - 2 september 1981." UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva, 1982, 110 - 119.
10. С.В.Кузьмин, Б.Г.Форштрем, П.Е.Викфельдт, Т.Сандхольм "Устройство для поворота дифракционной решетки". Авт.свид. СССР № 734510 (1980).
- II. Л.С.Сандахчиев. В кн. под ред. Д.Г.Кнорре "Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот", "Наука", Москва, 1973, стр.77-94.
12. R.P.W.Scott "Liquid Chromatography Detectors" Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1977.
13. M.Martin, C.Eon, G.Guichon, "Journal of Chromatography" 108 (1975), 229 - 241.

14. А.Гордон, Р.Форд "Спутник химика", "Мир", Москва, 1976, стр.237.
15. Г.В.Шишкин, А.А.Галь "Химия гетероциклических соединений", (1980), 831-836.
16. А.Foucault, M.Gaude, L.Oliveros, "Journal of Chromatography", 185 (1979), 345 - 360.

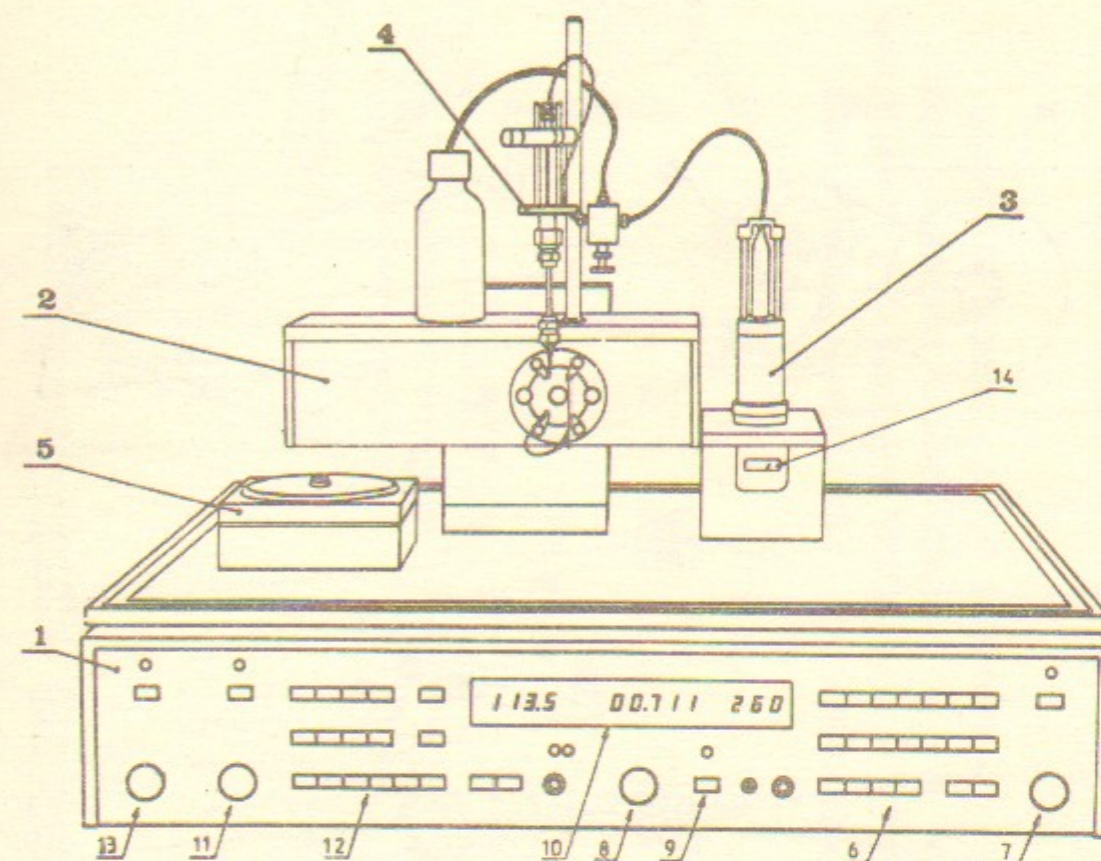


Рис. I. Общий вид хроматографа "Обь-4".

- 1 - электронный блок, 2 - оптический блок,
 3 - насос, 4 - устройство ввода образца и колонка,
 5 - коллектор фракций, 6 - панель управления монохроматором, 7 - переключатель времени интегрирования, 8 - переключатель масштаба рисунка, 9 - выключатель "вложения шкал", 10 - цифровой индикатор; слева направо - индикатор расхода элюента, индикатор оптической плотности, индикатор длины волны, 11 - переключатель скорости потока, 12 - панель управления насосом, 13 - регулятор объема фракций, 14 - индикатор давления

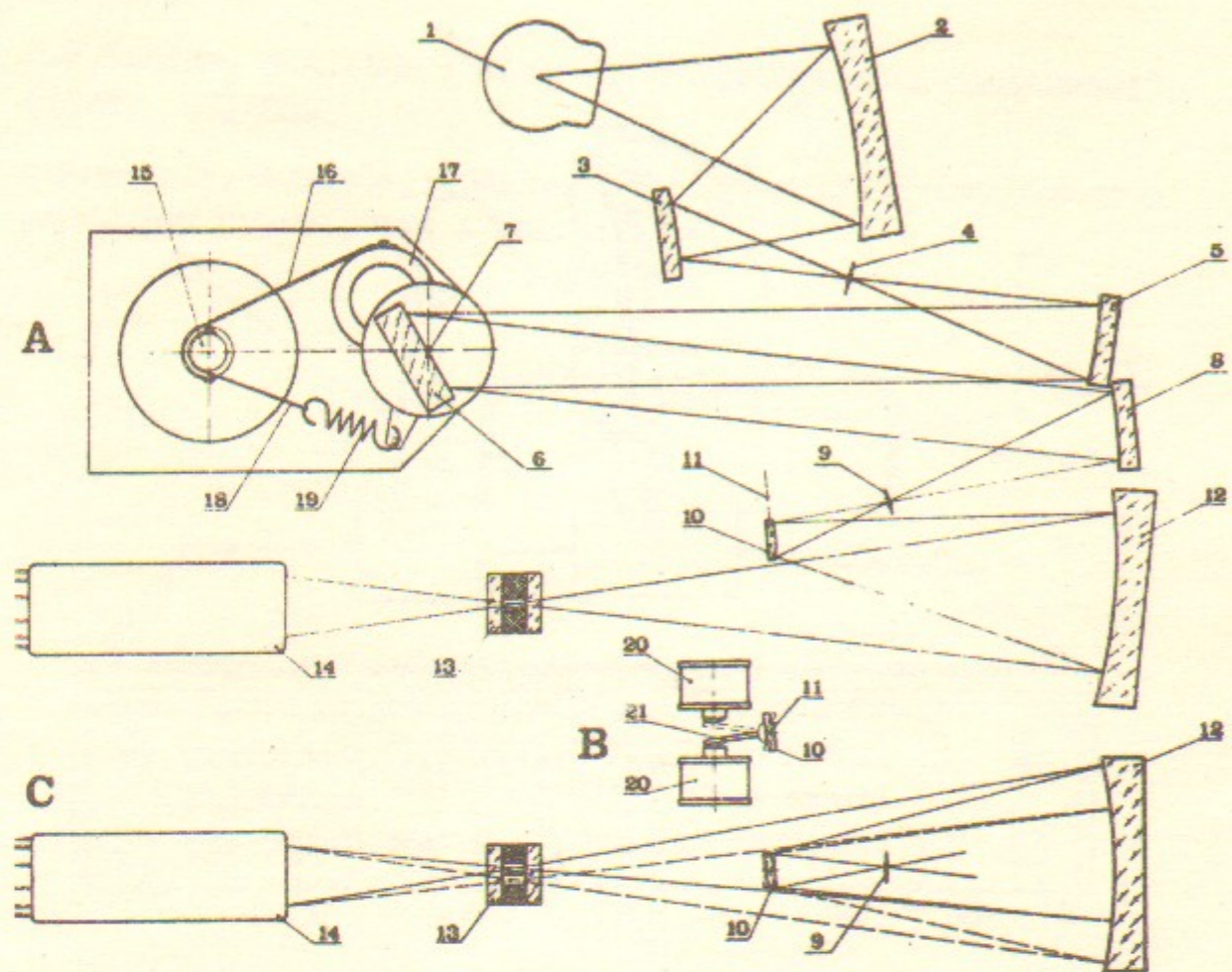


Рис.2. Оптикомеханическая схема детектора "Обь-4".

А - вид сверху, В - электромагнитный привод колеблющегося выпуклого зеркала, С - двухлучевая фотометрическая схема, вид сверху. I - дейтериевая лампа, 2,5,8,12 - вогнутые зеркала, 3 - цилиндрическое выпуклое зеркало, 4 - входная щель, 6 - дифракционная решетка, 7 - ось вращения решетки, 9 - диафрагма, 10 - колеблющееся выпуклое зеркало, 11 - ось вращения колеблющегося зеркала, 13 - блок кювет, 14 - фотоумножитель, 15 - ось шагового двигателя, 16 - стальная лента, 17 - нейлоновая нить, 18 - пружина.

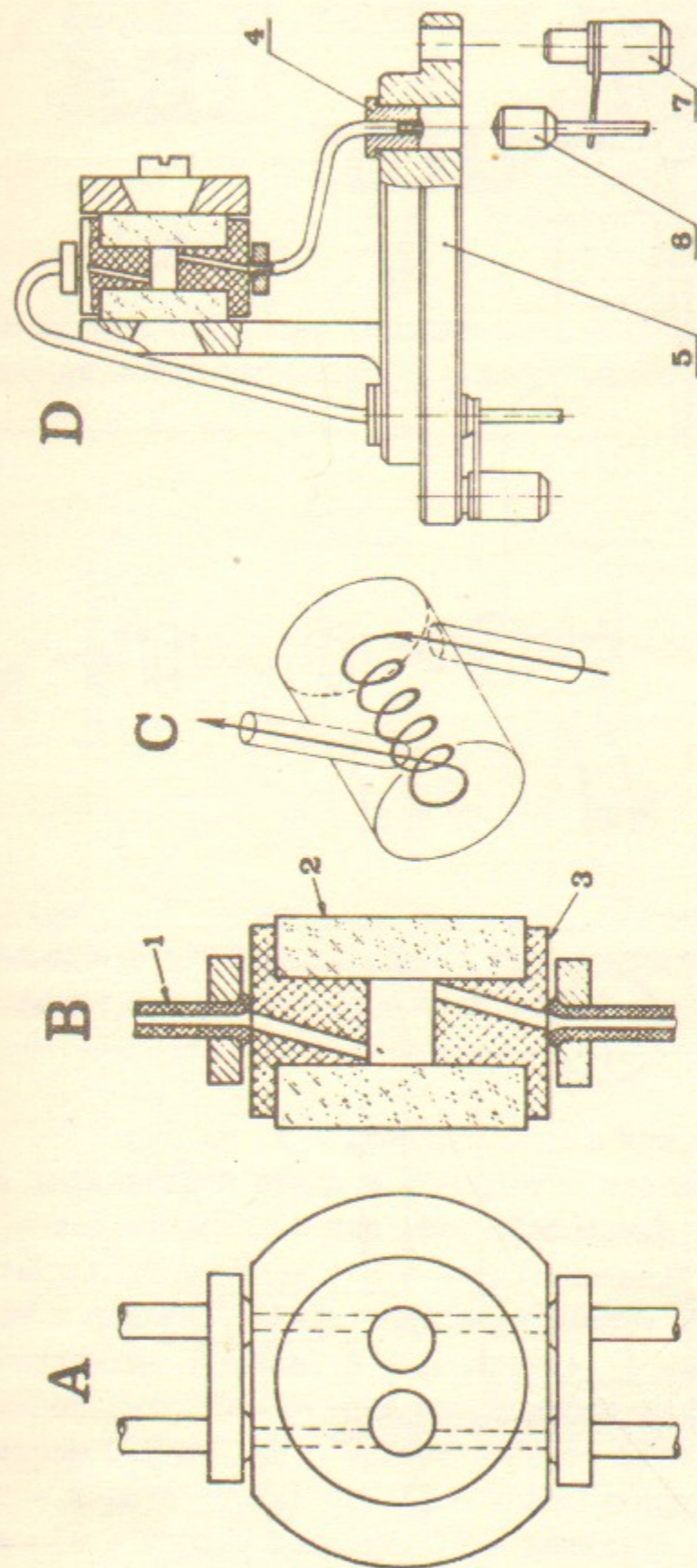


Рис.3. Блок-кювет. А - вид сверху, В - вид сбоку, С - гидродинамическая схема кюветы, Д - блок кювет в держателе. I - подводящие капилляры, 2 - кварцевые окна, 3 - фторопластовая прокладка, 4 и 6 - неподвижная и подвижная части соединителя, 5 - корпус держателя, 7 - фиксатор соединителя с пружиной

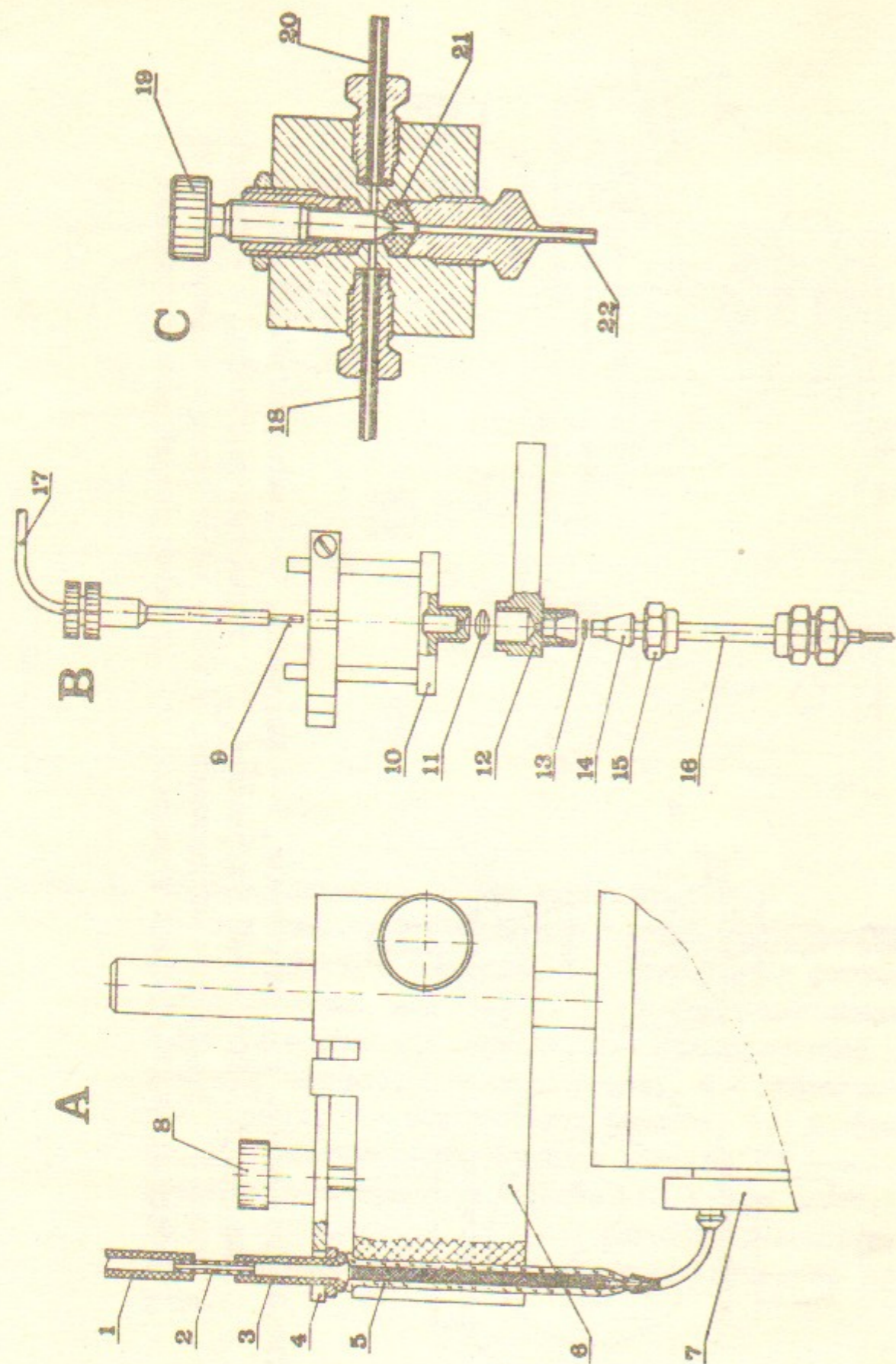


Рис.4. Колонки, устройство ввода образца и клапан

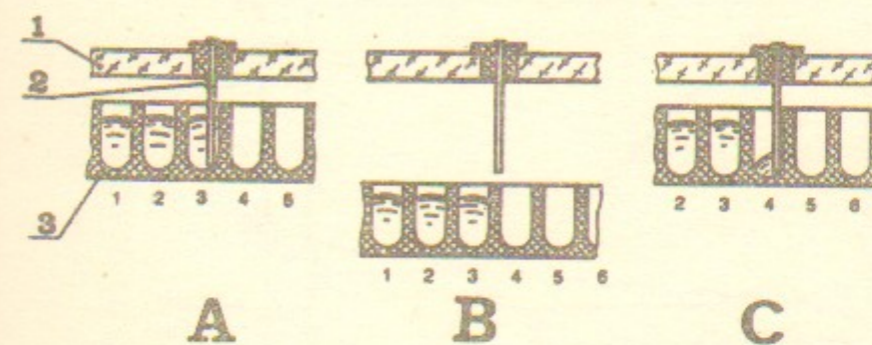


Рис.5 Схема работы коллектора фракций. А -конец сбора фракции, В-опускание диска коллектора и его поворот на 1/200 оборота, С -начало набора следующей фракции. 1 - стеклянная крышка, 2 -полипропиленовый капилляр, 3 - фторопластовый диск с лунками.

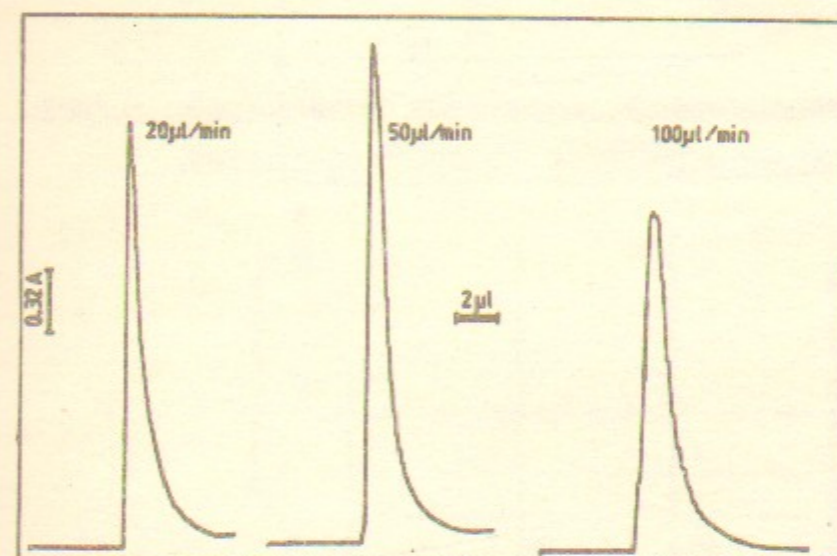


Рис.6 Проверка динамического объема кюветы. В поток растворителя (метанол) на входе входного капилляра кюветы вводилась резкоограниченная микродоза поглощающего вещества (0,1 мкл раствора р-нитроанилина в метаноле). Здесь представлены результаты фотометрирования при разных скоростях потока.

К рис.4: А - стеклянная колонка в держателе, В - колонка из нержавеющей стали и устройство ввода образца, С - клапан. 1 - полиэтиленовый или фторопластовый входной капилляр, 2 - стеклянный капилляр, 3 - полиэтиленовый патрубок с отформованным в пламени в виде полусферы нижним концом, 4 - пружина, 5 - стеклянная колонка, 6 - держатель, 7 - держатель кювет, 8 - прижимной винт, 9 - трубка из нержавеющей стали внутренним диаметром 0,2 мм, 10 - запорный винт, 11 - фторопластовое кольцо, 12 - корпус-держатель, 13 - уплотнитель, 14 - конус, 15 - гайка, 16 - корпус колонки, 17 - капилляр к клапану, 18 - капилляр к колонке, 19 - винт, 20 - капилляр к насосу, 21 - фторопластовое кольцо, 22 - трубка к резервуару с элюентом.

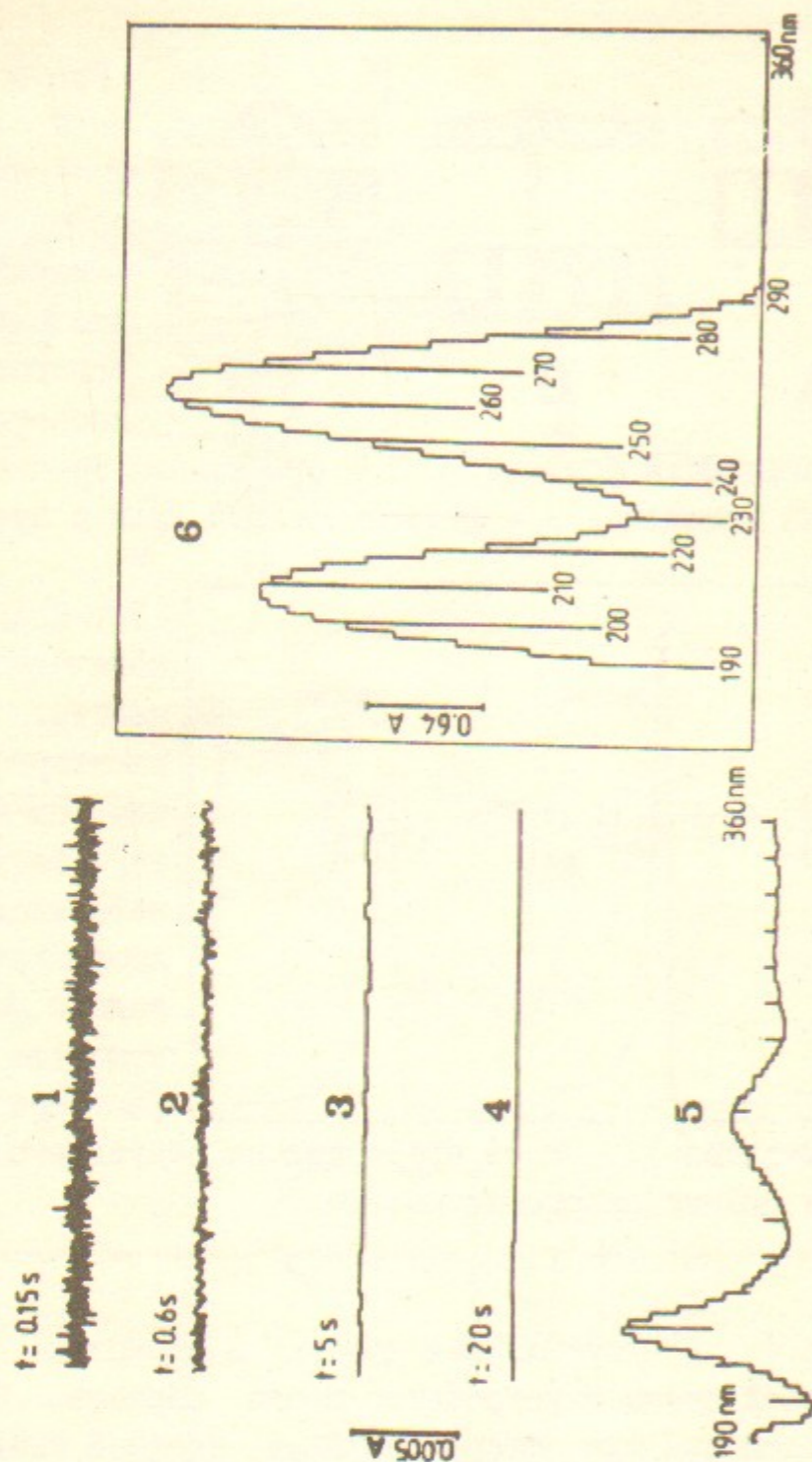


Рис.7 Некоторые характеристики детектора. 1-4 - величина шума при разных временах измерения ($\lambda=270$ нм), 5 - спектральная нулевая линия в диапазоне 190-360 нм (вертикальные метки - через 10 нм). Измерения 1-5 проводились без кювет. 6 - Спектр уридина (водный раствор), снятый через 2 нм в остановленном потоке.

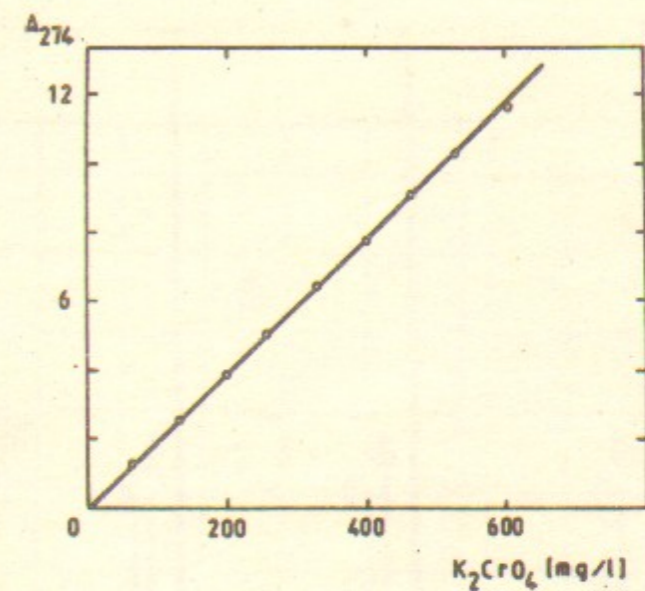


Рис.8. Линейность детектора. Зависимость показаний детектора "Обь-4" от концентрации раствора

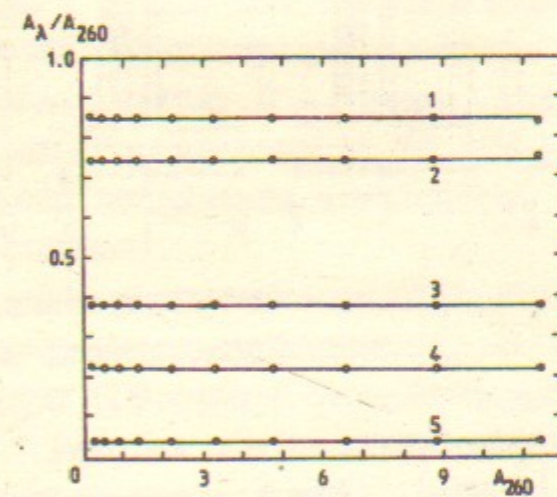


Рис.9. Зависимость спектральных отношений оптической плотности водного раствора уридина от его концентрации. 1 - A_{270}/A_{260} ; 2 - A_{250}/A_{260} ; 3 - A_{280}/A_{260} ; 4 - A_{230}/A_{260} ; 5 - A_{290}/A_{260}

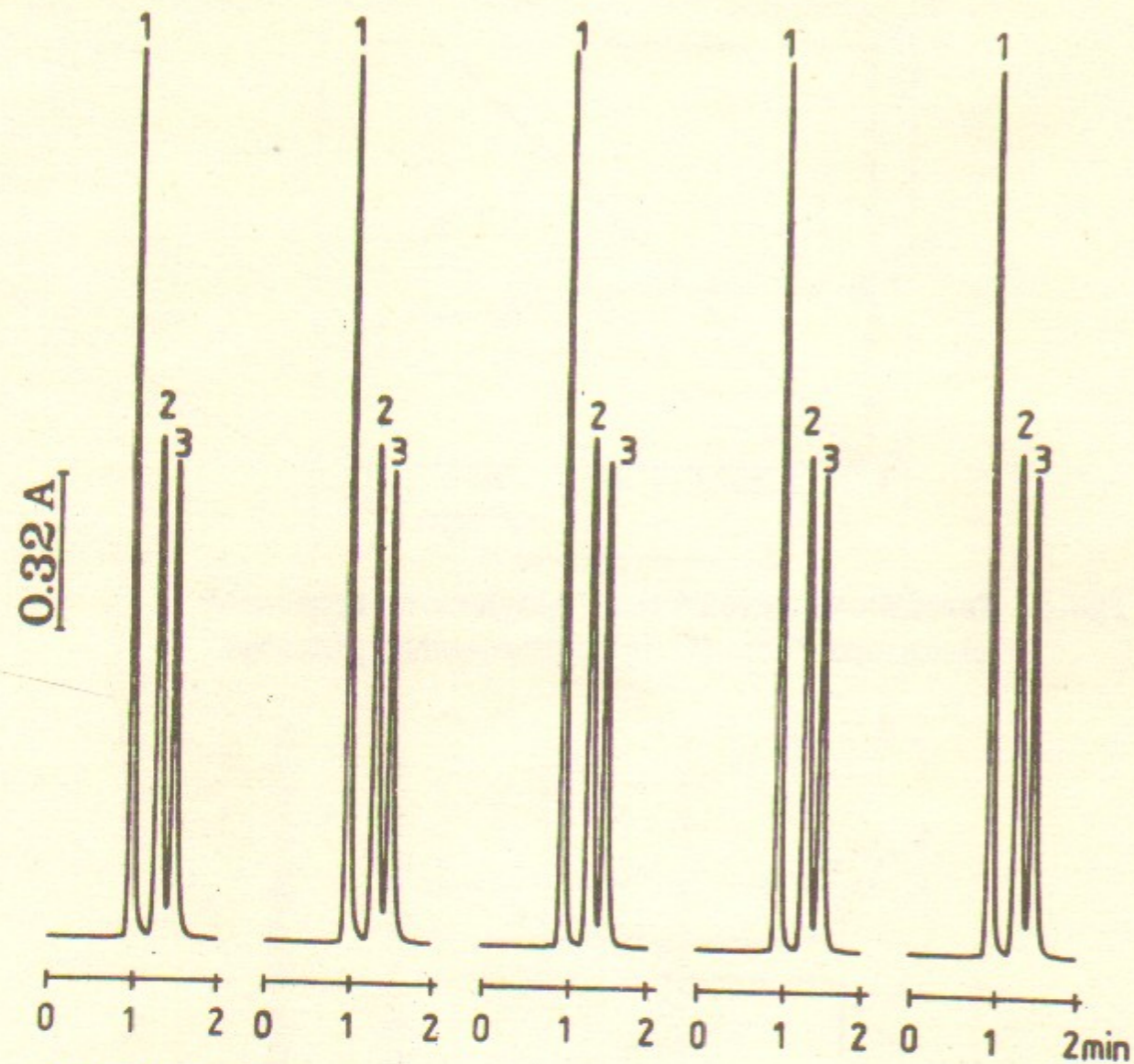


Рис. 10 Иллюстрация воспроизводимости дозирования образца. Произведены пять разделений смеси трех нитроанилинов (1 - орто-, 2 - мета-, 3 - пара-). Образец: 2 мкл (по 2 мкг каждого компонента). Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Силасорб 600 (5 мкм). Элюент: хлороформ. Скорость потока: 200 мкл/мин. Детектор: 270 нм.

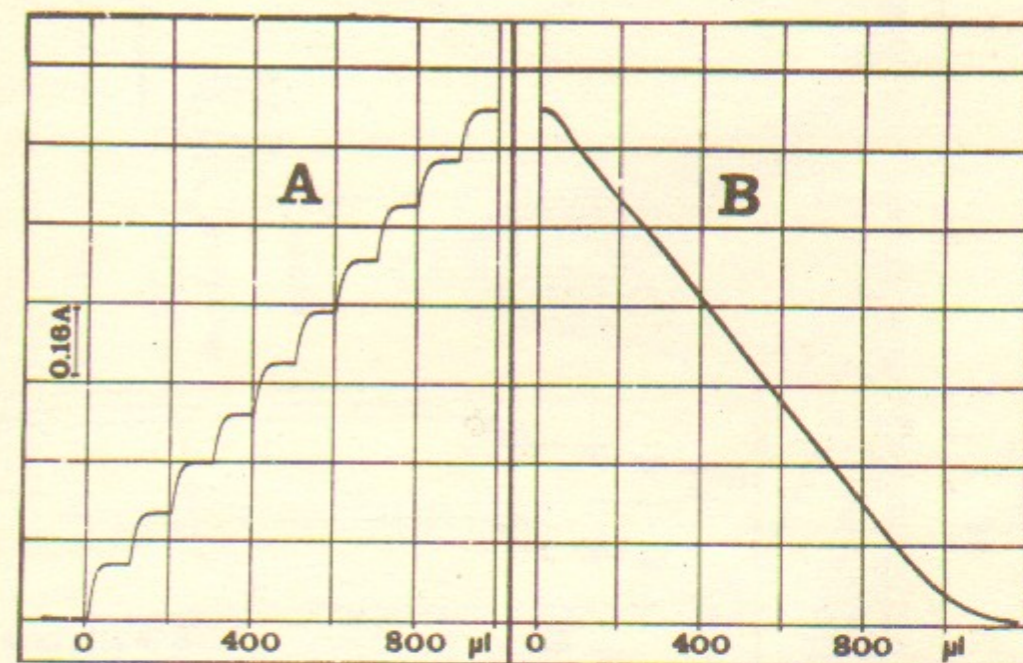


Рис. 11. Воспроизводимость формирования градиента концентрации. А - последовательный набор в шприц насоса порций по 100 мкл светопоглощающего раствора через кювету. Концентрация раствора от порции к порции увеличивается. В - кривая, полученная при прокачивании сформированного градиента через кювету (приведены результаты двух опытов - графики полностью совпадают).

Для получения градиента концентрации использовались смеси двух растворов - водный раствор уридина и 60% водный раствор метанола в пропорциях 9:1, 8:2, ..., 1:9, 0:10. Скорость потока: 200 мкл/мин. Проверка градиента (В) производилась через 5 мин после набора (А).

К Рис. 12. Разделение смеси аминов. Колонка $\varnothing 1 \times 70$ мм с Дауэкс 50 x 8. Элюент: градиент концентрации HCl в 50% этаноле от 0,4 до 4,0 М. Скорость потока: 20 мкл/мин. Образец: по 5 мкг каждого амина. Измерения производились последовательно при семи длинах волн. Время измерения: 1,2 сек на каждой из длин волн. В рамке - увеличенный фрагмент хроматограммы, демонстрирующий принцип многоволновой регистрации в режиме разделения времени.

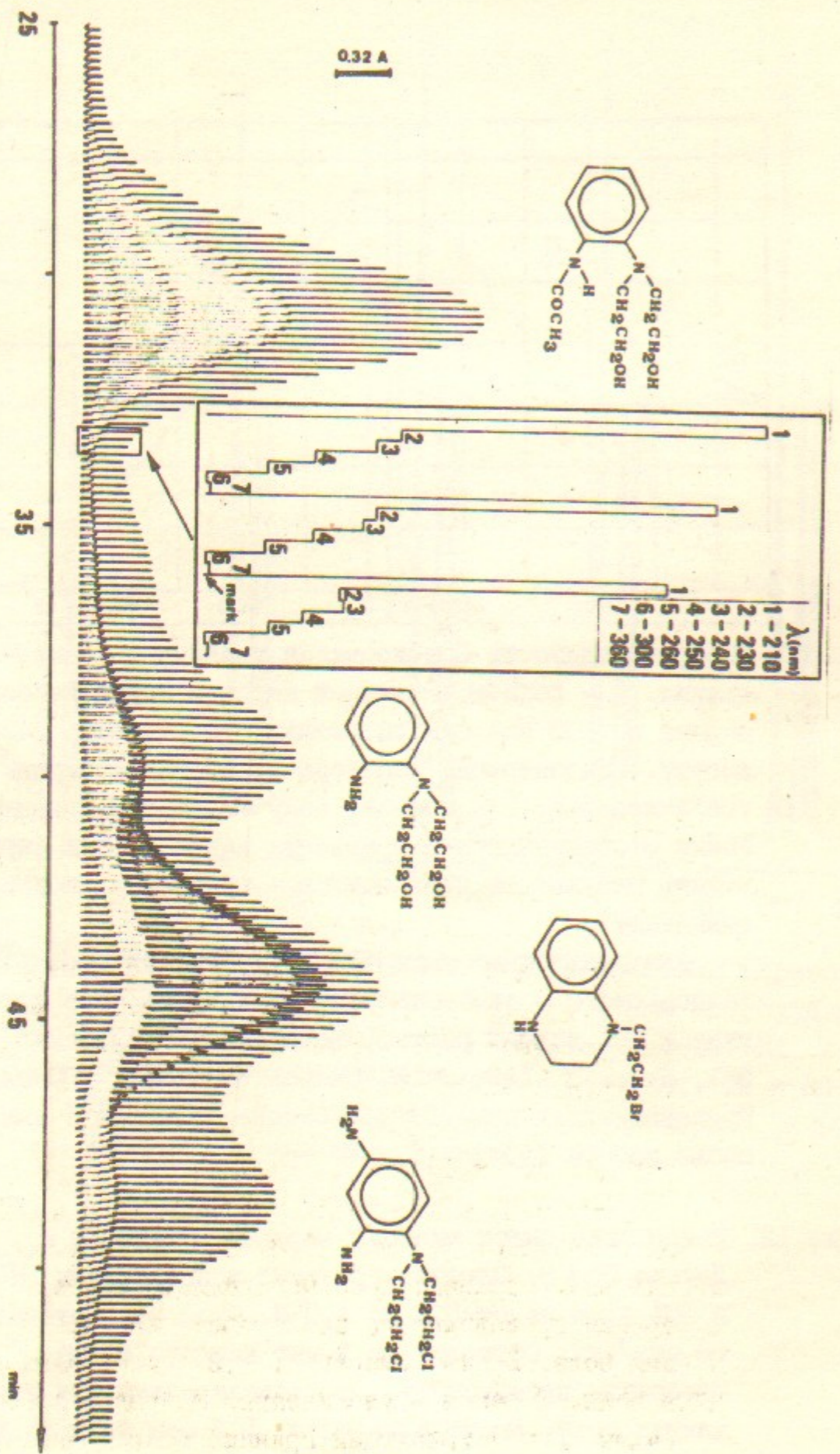


Рис. 12

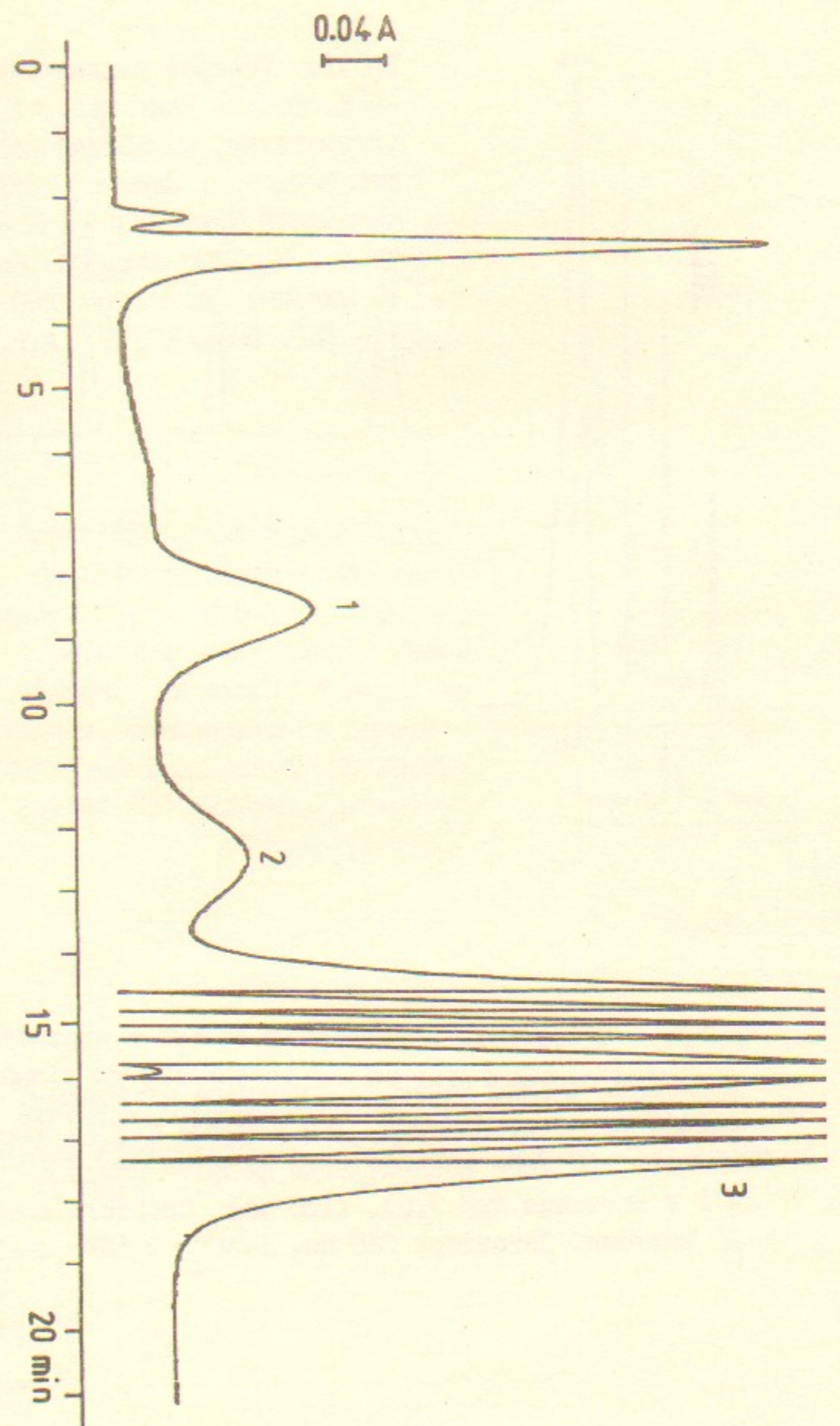


Рис. 13

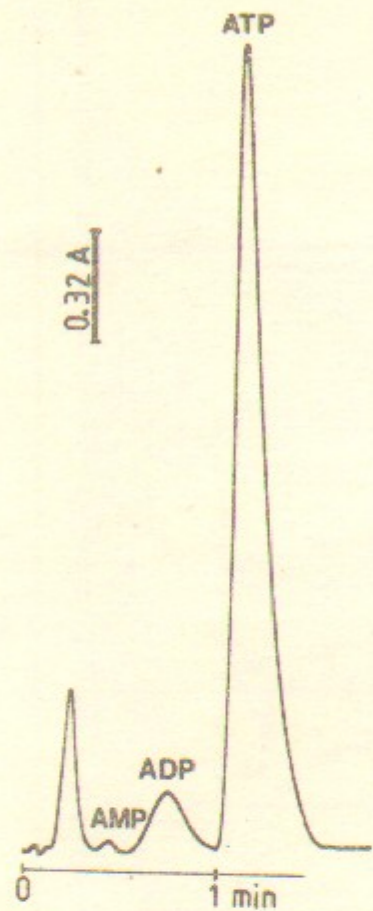


Рис.14. Быстрое разделение аденозин-5'-фосфатов. Колонка: ϕ 1 x 50 мм с силикагелем, модифицированным полиэтиленимином. Элюент: градиент концентрации Трис-НСl (рН 8,0) от 0,2 до 1,2 М, 1100 мкл. Скорость потока: 20 мкл/мин. Детектор: 260 нм. 1 - АМР, 2 - АДР, 3 - АТР.

К Рис.13. Анализ качества препарата аденозин-5'-трифосфорной кислоты. Колонка ϕ 2 x 30 мм с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюент: градиент концентрации фосфата калия от 0 до 0,2 М в 7 М мочевины (рН 7,5), 1100 мкл. Скорость потока: 20 мкл/мин. Детектор: 260 нм. 1-АМР, 2-АДР, 3-АТР.

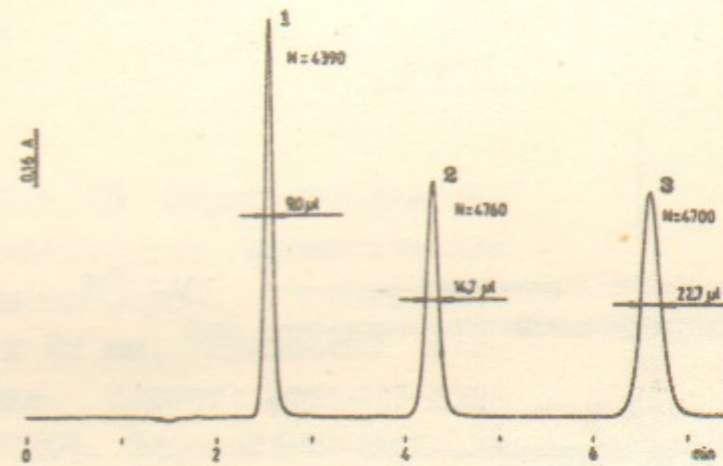


Рис.15 Проверка эффективности микроколонки. Разделение модельной смеси нитроанилинов (1 - орто-, 2 - мета-, 3 - пара-). Колонка: ϕ 1 x 62 мм, Силасорб 600, 5 мкм. Образец: 1 мкл, по 1 мкг каждого компонента. Элюент: гептан-хлороформ-2-пропанол (70:22:8). Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор: 290 нм.

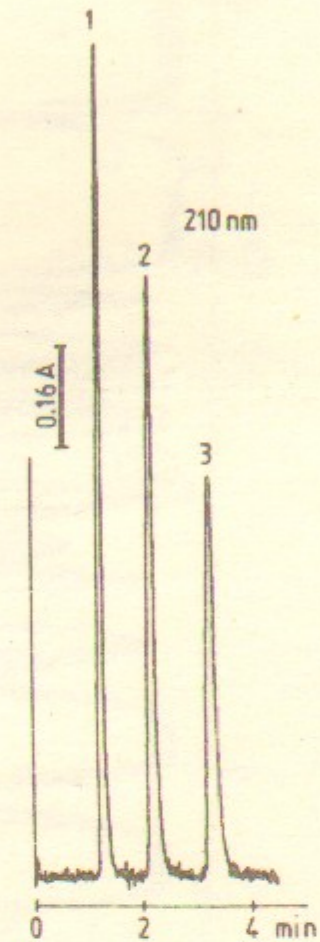


Рис.16

Пример детекции в сильно поглощающем элюенте. Разделение модельной смеси нитроанилинов (2 мкл, по 2 мкг каждого компонента). Элюент и колонка такие же, как и на рис.15, но колонка меньшей эффективности. Скорость потока 200 мкл/мин. Детектор: 210 нм.

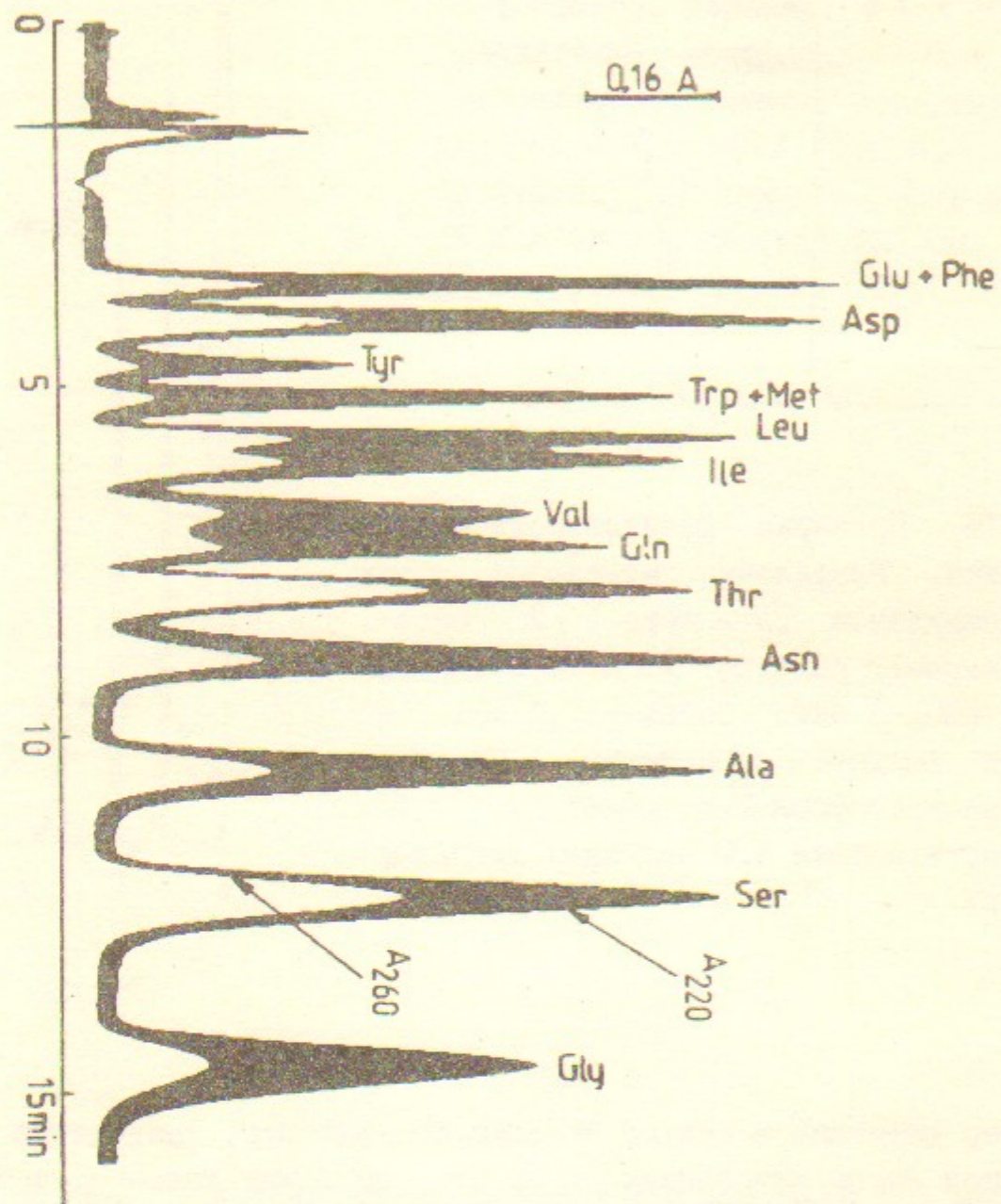


Рис.17. Разделение смеси аминокислот на силикагелевой колонке, насыщенной медным аммиачным раствором. Колонка: \varnothing 2x62 мм, Силасорб 600. Элюент: вода-ацетонитрил (40:60) - 0,35 М аммиак. Скорость потока: 100 мкл/мин. Детектор: 220 и 260 нм. Образец: Tyr, Trp, Asp, Gly и Phe - по 2 нмоль каждой, остальные аминокислоты - по 100 нмоль в 10 мкл воды.

Рис.18. Обращенно-фазовая хроматография ароматических углеводородов. Колонка: \varnothing 2 x 62 мм, Нуклеосил C18, 5 мкм. Элюент: метанол-вода (80:20). Скорость потока 50 мкл/мин. Детектор: 280 и 340 нм. Образец: 0,5 - 5 мкг углеводородов в 2 мкл метанола.

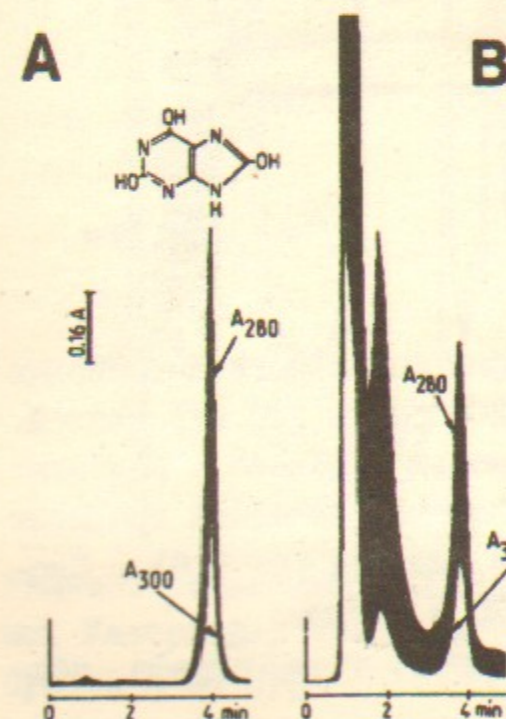
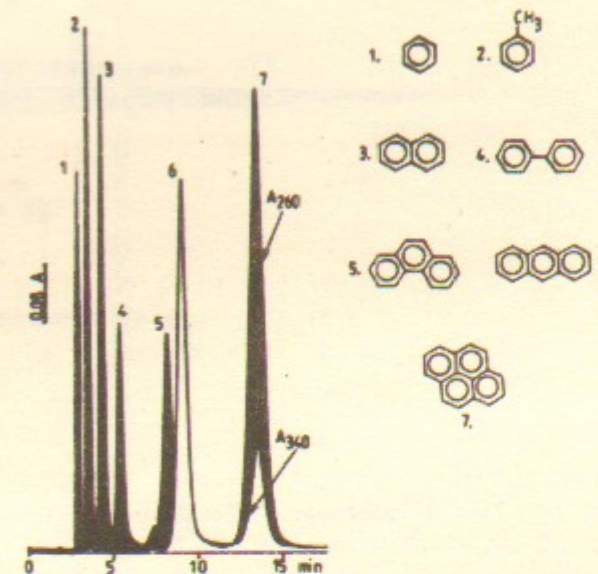


Рис.19. Определение содержания мочевой кислоты в сыворотке крови человека с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Колонка: \varnothing 2 x 62 мм, Нуклеосил C18, 5 мкм. Элюент: 4% метанола в 0,01 М уксусной кислоте. Скорость потока: 100 мкл/мин. Детектор: 280 и 300 нм. А - стандарт, 5 мкг мочевой кислоты в воде. В - 5 мкл сыворотки человеческой крови.

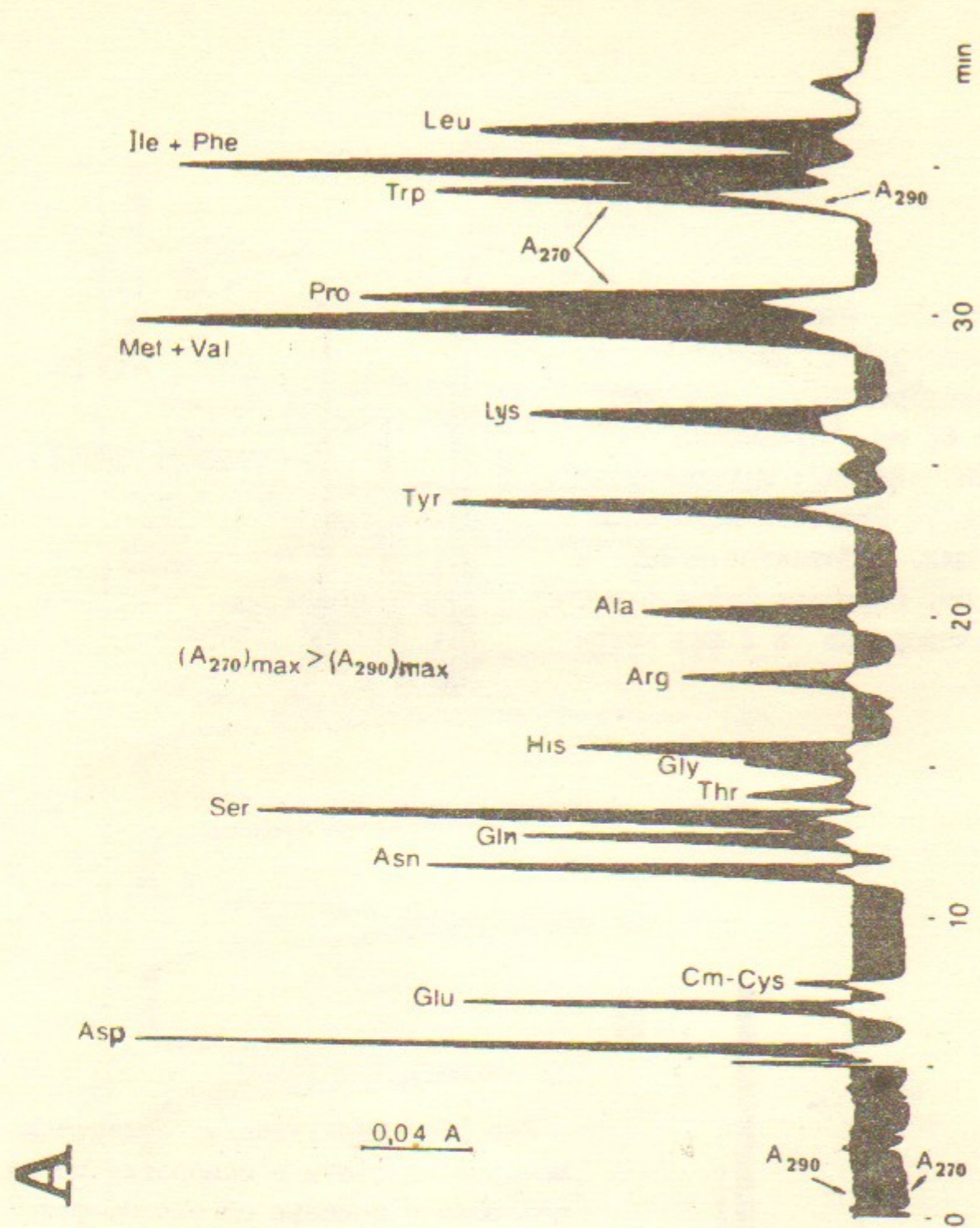


Рис.20 Обращенно-фазовая хроматография фенилтиогидантоиновых производных аминокислот. Образец: по 200 рмоль (40 нг) каждой. А - хроматограмма, полученная с помощью "Обь-4". Колонка: $\varnothing 2 \times 62$ мм, Нуклеосил С18, 5 мкм. Элюент: линейный градиент ацетонитрила (20-50%) в 0,01 М ацетате аммония (рН 5,8). Скорость потока: 50 мкл/мин. Детектор: 270 и 290 нм.

В - хроматограмма, полученная с помощью хроматографа пеп-

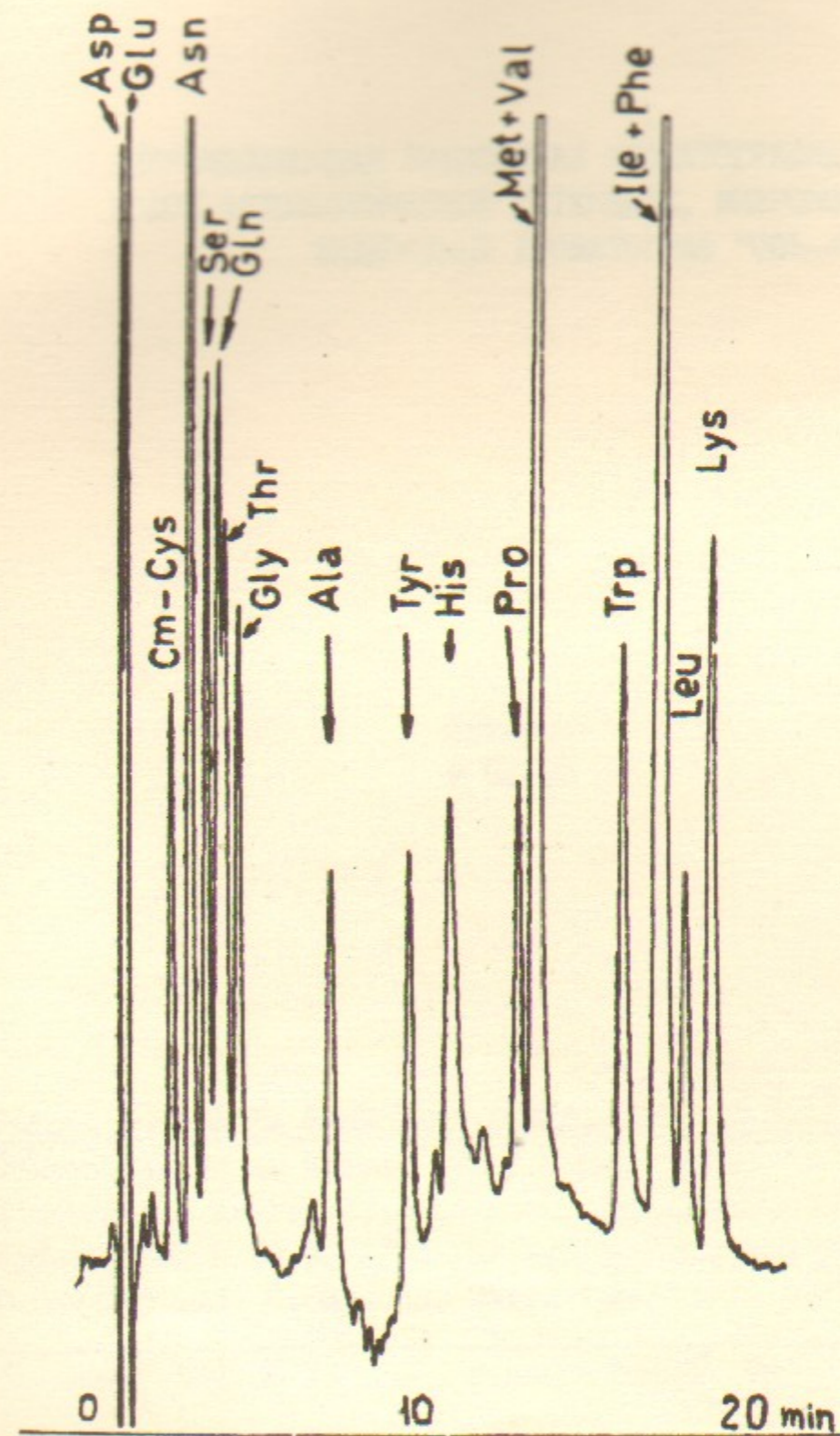


Рис.20 В

тидного секвенатора СЕКВЕМАТ (Бостон, США). Колонка: $\varnothing 4,6 \times 105$ мм, Ультрасфер ODS C18, 5 мкм. Элюент: линейный градиент от буфера А до буфера В. Скорость потока: 1,5 мл/мин. Буфер А: 220 мл метанола, 110 мл ацетонитрила, 50 мл 0,06 М трифторацетата натрия (рН 6,0), вода до 1 л. Буфер В: 220 мл метанола, 300 мл ацетонитрила, 140 мл 0,06 М трифторацетата натрия (рН 3,4), вода до 1 л.

Г.И.Барам, Ю.А.Болванов, М.А.Грачев, В.В.Каргальцев,
Н.И.Комарова, С.В.Кузьмин, Э.А.Купер, М.П.Перельройзен

МИКРОКОЛОНОЧНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ С МНОГОВОЛ-
НОВОЙ ФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ. МИКРОКОЛОНОЧНЫЙ
ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ "ОВЬ-4"

Препринт
№ 83-90

Работа поступила 5 августа 1983г.

Ответственный за выпуск - С.Г.Попов

Подписано к печати 12.08.1983г. МН 03295

Формат бумаги 60x90 1/16 Усл.2,5 печ.л., 2,0 учетно-изд.л.

Тираж 290 экз. Бесплатно. Заказ №90

Ротапринт ИЯФ СО АН СССР, г.Новосибирск, 90