

Основные компоненты хроматографа

В данной работе используется ВЭЖХ система PerkinElmer Series 200, состоящая из следующих компонентов (Рисунок 1):

- Емкости с подвижной фазой
- Насос
- Автоматическое устройство для ввода проб (автосэмплер)
- Колоночный термостат
- Спектрофотометрический детектор



Рисунок 1. Основные компоненты ВЭЖХ системы PerkinElmer Series 200

Система работает по следующему принципу. Подвижная фаза постоянно прокачивается насосом через хроматографическую колонку, находящуюся в термостате. При этом в насосе установлен смеситель, позволяющий смешивать жидкости из разных емкостей (до 4-х) и таким образом менять состав подвижной фазы. Анализируемый

раствор вводится в поток подвижной фазы перед входом в колонку при помощи автосэмплера. При правильно подобранных параметрах исследуемая смесь разделяется в колонке на отдельные компоненты, последовательно выходящие из колонки. На выходе из колонки установлен спектрофотометрический детектор, постоянно измеряющий поглощение на заданной длине волны. Детектор подключен к ПК через АЦП. Запись хроматограммы (зависимости поглощения от времени) и обработка данных осуществляется в программном обеспечении МультиХром 3.4.

Насос PE Series 200 Pump

PE Series 200 Pump – поршневой насос, способный работать в изократическом и градиентном режимах (Рисунок 2, Таблица 1). В изократическом режиме предусмотрено изменение скорости потока растворителя, времени пропускания вещества через колонку, процентного состава подвижной фазы. В градиентном режиме также указывается вид кривой зависимости состава растворителя от времени (чаще всего используются линейные градиенты).

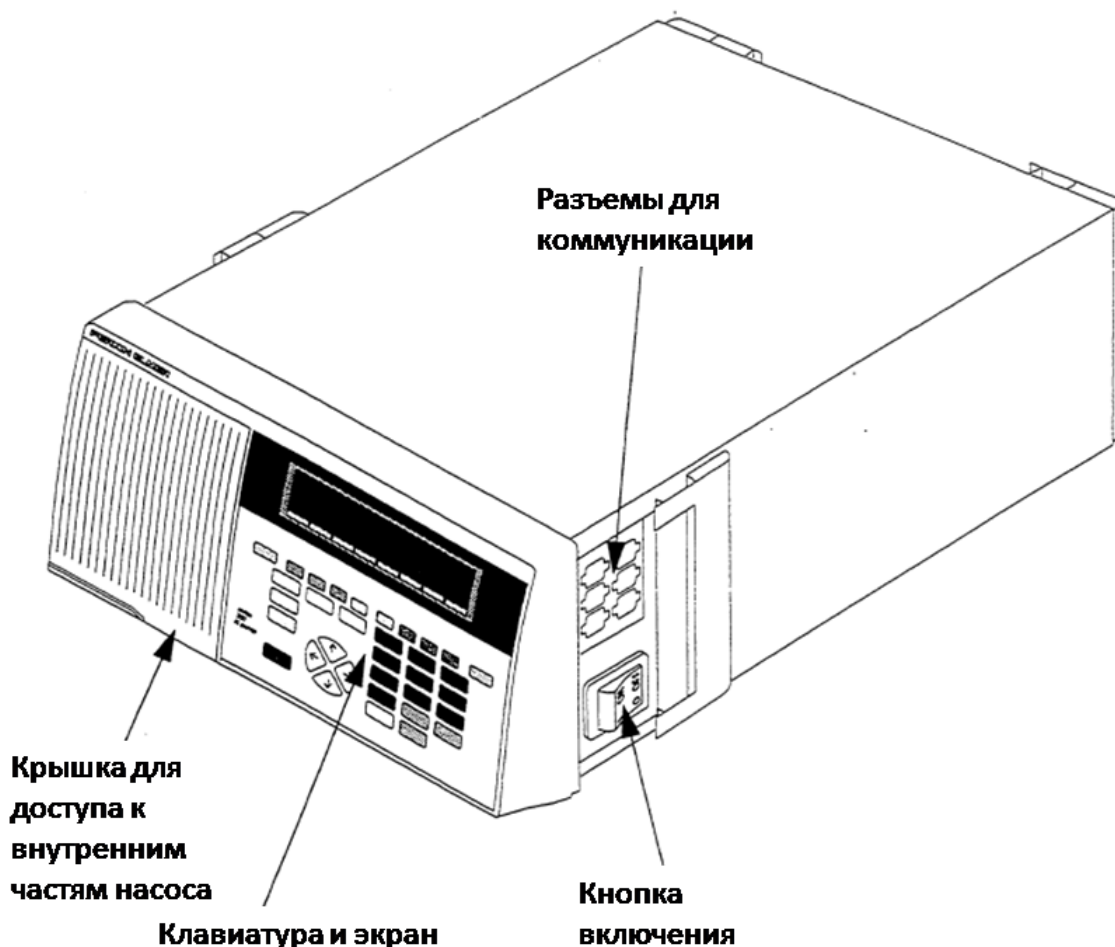


Рисунок 2. Общий вид насоса PE Series 200 Pump (передняя и правая панели)

Таблица 1. Некоторые характеристики насоса PE Series 200 Pump

Характеристики	Значения
Рабочее давление	0 – 420 бар
Скорость потока	0,01 – 10 мл/мин
Случайная погрешность скорости потока (Precision)	0,3% RSD* (обычно <0,1% RSD*) при 1 мл/мин и давление 70 бар, с водой в качестве подвижной фазы
Систематическая погрешность скорости потока (Accuracy)	±1% от заданного значения при 1 мл/мин и давление 70 бар, с водой в качестве подвижной фазы
Воспроизводимость времени удерживания	0,3% RSD* (обычно <0,1% RSD*)
Диапазон допустимых концентраций	0 – 100% растворитель А - D
Систематическая погрешность концентрации (Accuracy)	±1% при 3 – 97% и 5 мл/мин
Случайная погрешность концентрации (Precision)	Обычно <0,2%
Градиентная кривая	линейная, экспоненциальная
Диапазон времени анализа	0 – 999 мин

*RSD – Относительное стандартное отклонение (Relative Standard Deviation)

Автоматическое устройство для ввода проб PE Series 200 Autosampler

PE Series 200 Autosampler – устройство для ввода проб в колонку, предназначенное для анализа большого количества образцов в автоматическом режиме без участия оператора. Позволяет задавать объем и скорость отбора пробы, объем промывки, осуществляемой после ввода пробы, количество циклов промывки, а также количество повторных анализов каждого образца (Рисунок 3, Рисунок 4 , Таблица 2).

Таблица 2. Некоторые характеристики автоматического устройства для ввода проб PE Series 200 Autosampler.

Характеристики	Значения
Объем анализируемой пробы	0,1 мкл – 2,5 мл
Случайная погрешность	<0,5% RSD* площади пика, при объеме от 3 мкл

Количество повторных анализов каждого образца	1-99
Объем промывки	0-2500мкл
Количество циклов промывки	1-9
Перенос вещества между образцами	<0,02%

*RSD – Относительное стандартное отклонение (Relative Standard Deviation)

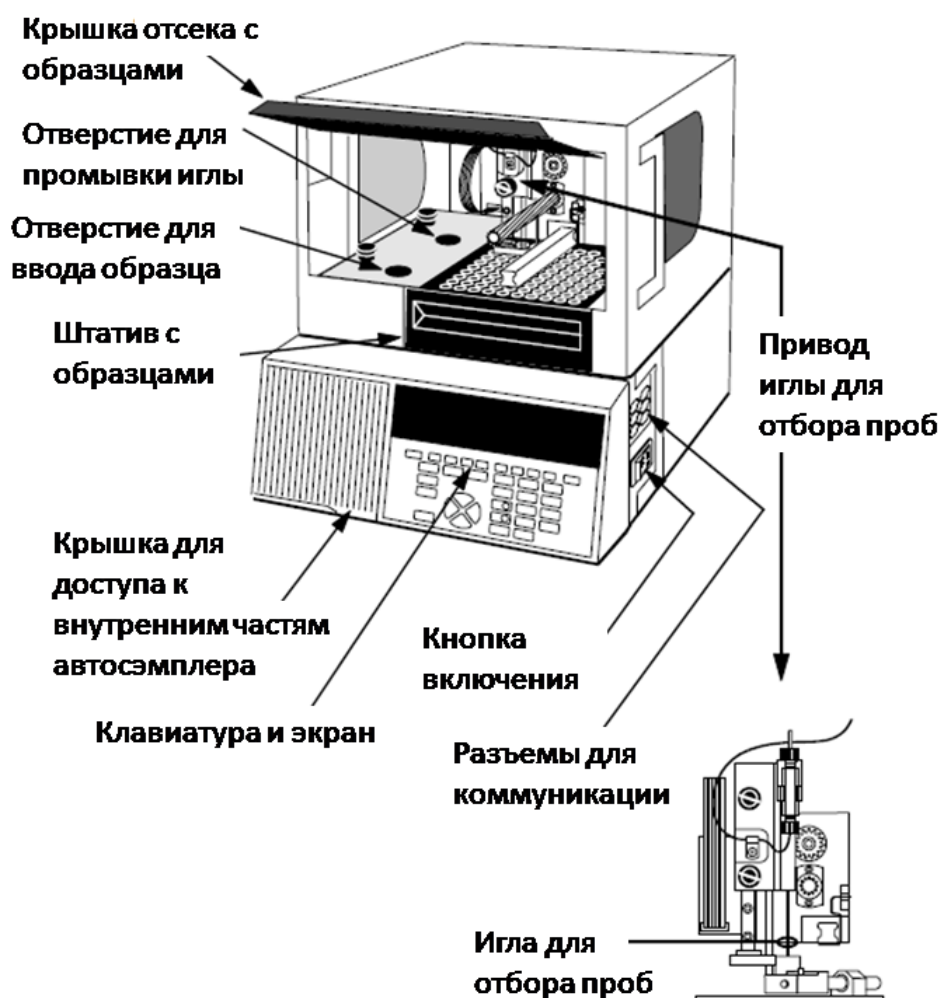


Рисунок 3. Общий вид автоматического устройства для ввода проб PE Series 200 Autosampler (передняя и правая панели)

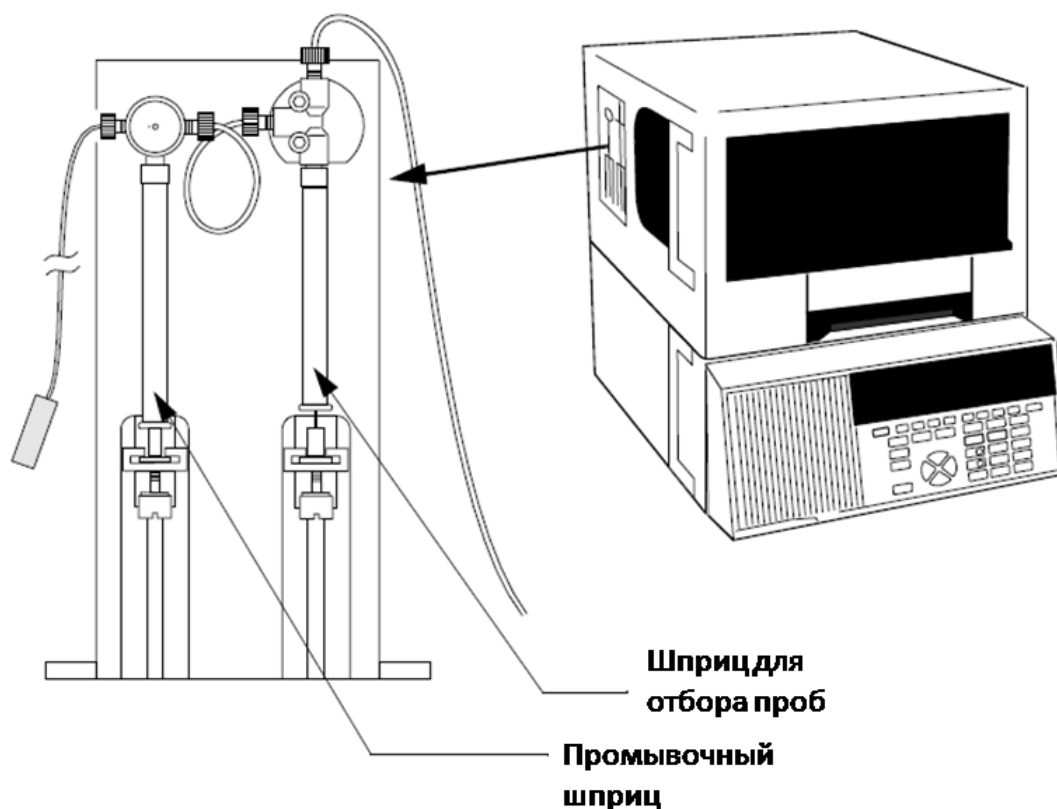


Рисунок 4. Общий вид автоматического устройства для ввода проб PE Series 200 Autosampler (передняя и левая панели)

Колоночный термостат PE Series 200 Peltier Column Oven

PE Series 200 Peltier Column Oven - термостат, предназначенный для контроля температуры хроматографической колонки. Позволяет как нагревать, так и охлаждать колонку относительно комнатной температуры (Рисунок 5, Рисунок 6, Таблица 3).

Таблица 3. Некоторые характеристики термостата PE Series 200 Peltier Column Oven

Характеристики	Значения
Диапазон температур	5-90°C (охлаждение не более, чем на 15°C от комнатной температуры)
Рекомендованная скорость потока	до 5 мл/мин
Систематическая погрешность температуры (Accuracy)	±1°C
Стабильность температуры	0,2°C
Скорость изменения температуры	до 5°C/мин
Время стабилизации температуры	30 мин после установки



Рисунок 5. Общий вид колоночного термостата PE Series 200 Peltier Column Oven (передняя панель)



Рисунок 6. Колоночное отделение термостата PE Series 200 Peltier Column Oven

Хроматографическая колонка "Биохиммак Диасфер C₁₈"

Хроматографическая колонка "Биохиммак Диасфер C₁₈" предназначена для использования в системах ВЭЖХ и представляет собой снабженную торцевыми соединениями металлическую трубку, заполненную мелкозернистым упаковочным материалом (сорбентом) (Таблица 4). С обеих сторон трубка закрыта фильтрами для удержания сорбента внутри колонки.

Таблица 4. Некоторые характеристики обращенно-фазовой ВЭЖХ колонки "Биохиммак Диасфер C₁₈"

Характеристики	Значения
Размер колонки	4,0 мм × 250 мм
Размер зерна сорбента	5 мкм
Допустимый диапазон pH	2 – 8
Максимально допустимая температура	70°C
Максимальное давление	300 бар

Детектор PE Series 200 UV/VIS Detector

PE Series 200 UV/VIS Detector представляет собой спектрофотометр, способный измерять поглощение света как в ультрафиолетовой, так и в видимой области спектра (Рисунок 7, Таблица 5). В основе его работы лежит закон Бугера–Ламберта–Бэра, согласно которому поглощение линейно зависит от концентрации поглощающего вещества в растворе.

Таблица 5. Некоторые характеристики детектора PE Series 200 UV/VIS Detector

Характеристики	Значения
Диапазон длин волн	190 – 700 нм
Точность задания длины волны	±1 нм
Шумы	< 1·10 ⁻⁵ AU*, в диапазоне 210 – 280 нм
Источники света	Дейтериевая лампа (190 – 360 нм) или вольфрамовая лампа (360 – 700 нм)

*AU - Absorbance Unit (поглощение).

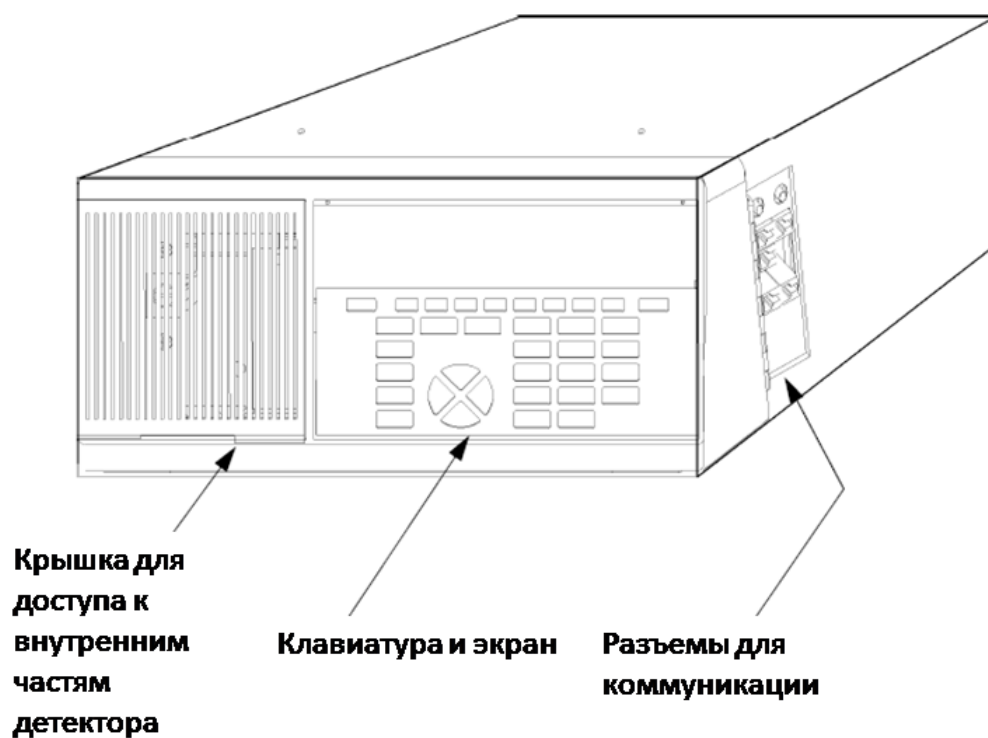


Рисунок 7. Общий вид насоса детектора PE Series 200 UV/VIS Detector (передняя и правая панели)

Для повышения стабильности сигнала в детекторе PE Series 200 UV/VIS Detector реализована двухлучевая оптическая схема (Рисунок 8), которая включает в себя: источник света – дейтериевую или вольфрамовую лампу, монохроматор (в качестве диспергирующего элемента используется дифракционная решетка), два фокусирующих зеркала, ячейку с образцом, сравнительную ячейку и два кремниевых фотодиода.

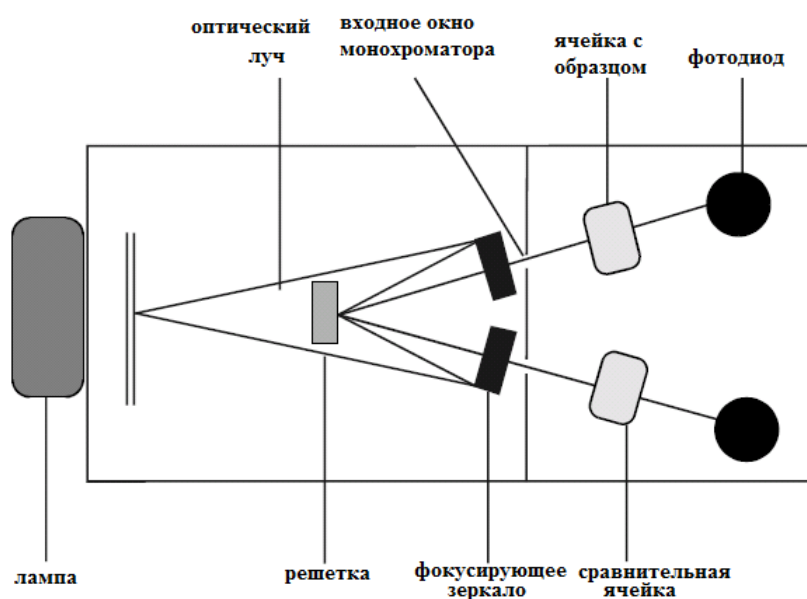


Рисунок 8. Оптическая схема детектора PE Series 200 UV/VIS Detector

Порядок работы

1. Включение прибора

2. Задание параметров работы насоса PE Series 200 Pump

После включения экран насоса должен выглядеть, как на рисунке.



Для задания параметров работы насоса нажмите кнопку (F2) на клавиатуре.



На экране появится меню выбора параметров.



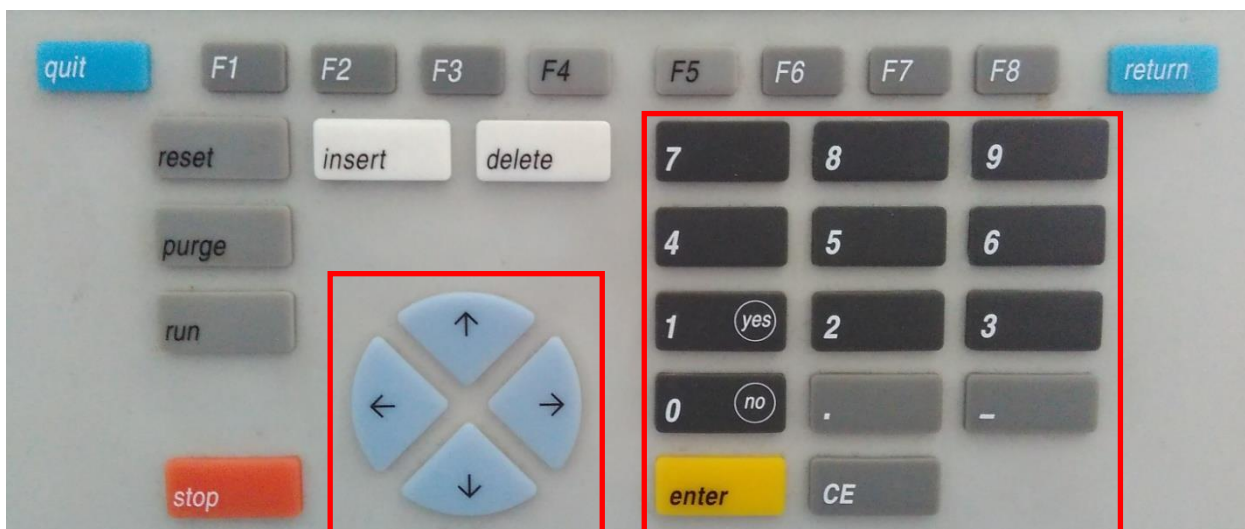
Нажмите кнопку Insert для добавления в метод строки с номером 1.



The screenshot shows a blue LCD screen with white text. At the top, it displays 'METHOD00' and 'SHTDN'. Below this is a table with two rows of data. The first row is labeled '0' and the second row is labeled '>1'. The columns represent different parameters: STEP, TIME, FLOW, %A, %B, %C, and %D. At the bottom of the screen, there is a status bar showing 'ELAPSED TIME *4.5' and a row of buttons labeled 'STEP', 'NEW', and 'STOR'.

STEP	TIME	FLOW	%A	%B	%C	%D
0	10.0	2.00	0.0	0.0	0.0	100
>1	10.0	2.00	0.0	0.0	0.0	100

Параметры в строке с номером 1 используются во время анализа, параметры в строке 0 используются для уравнивания колонки между анализами. Все параметры, за исключением времени, в строках 0 и 1 должны совпадать. Установите при помощи стрелок и цифровой клавиатуры необходимые параметры работы насоса.



METHOD00			SHTDN				2 BAR
STEP	TIME	FLOW	%A	%B	%C	%D	CURV
0	3.5	2.00	0.0	100	0.0	0.0	
>1	40.0	2.00	0.0	100	0.0	0.0	
ELAPSED TIME							*4.5
STEP		NEW			STOR		

Для сохранения параметров нажмите кнопку **return**.



METHOD00	CHNGD	SHTDN					2 BAR
DEFAULT							
STEP	TIME	FLOW	%A	%B	%C	%D	CURV
0	3.5	2.00	0.0	100	0.0	0.0	0.0
ELAPSED TIME							*4.5
VIEW	PUMP	T.E.	PRES	SEQ	DIR	CNFG	STRT

Для запуска насоса нажмите кнопку **F8**.




```

METHOD00 CHNGD EQUIL 48 BAR
DEFAULT
STEP TIME FLOW %A %B %C %D CURV
0 0.1 2.00 0.0 100 0.0 0.0 0.0
ELAPSED TIME *0.1
VIEW PUMP T.E. PRES SEQ DIR CNFG

```

3. Задание параметров работы детектора PE Series 200 UV/VIS Detector

После включения экран детектора должен выглядеть, как на рисунке.

```

METHOD02 STORD READY AU: -0.0051
STEP TIME λ RSP AZ
1 40.00 254 0.02 N
ELAPSED TIME
VIEW EDIT SEQ DIR CNFG

```

Для задания параметров работы детектора нажмите кнопку (F2) на клавиатуре. На экране появится меню выбора параметров.

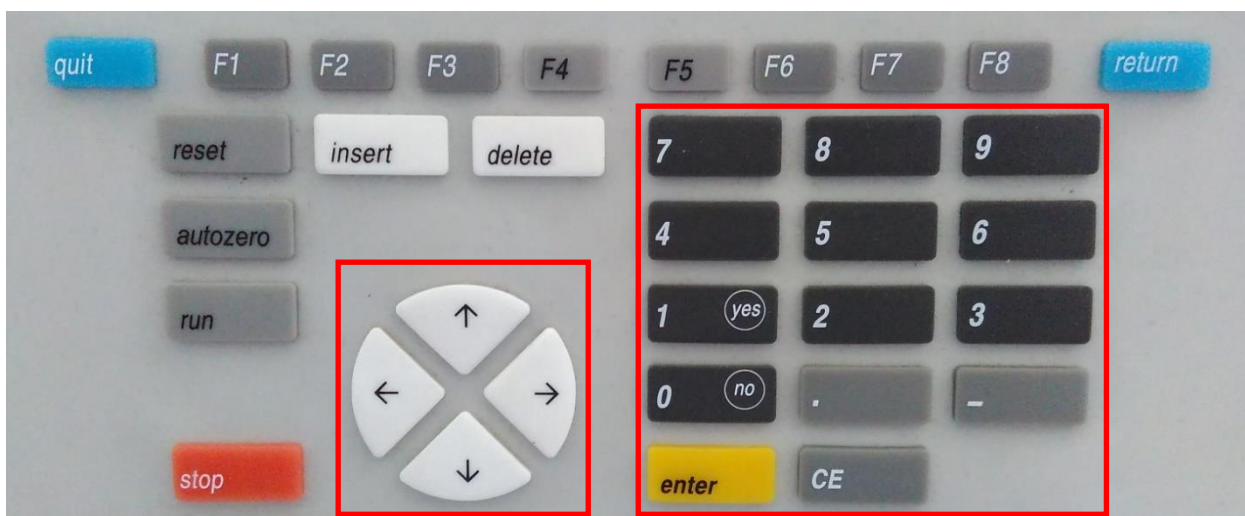


```

METHOD02 STORD READY
STEP TIME λ RSP AZ
> 1 40.00 254 0.02 N
ENTER TIME (0.01 TO 999.99 MIN)
STEP NEW T.E. STOR

```

Установите при помощи стрелок и цифровой клавиатуры необходимые параметры работы детектора.

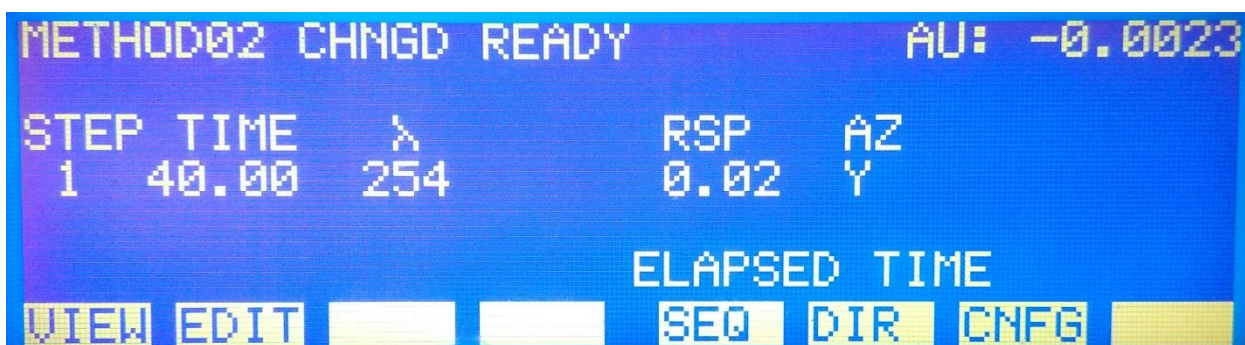


Затем при помощи стрелок переместите указатель на пункт AZ (автообнуление детектора перед началом анализа) и нажмите кнопку **F2** для активации автообнуления.



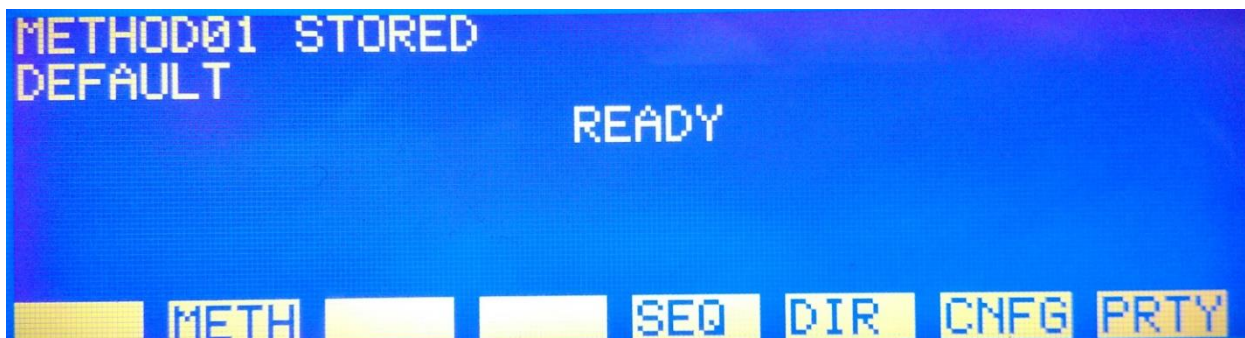


Для сохранения параметров нажмите кнопку **return**.



4. Задание параметров работы автосэмплера PE Series 200 Autosampler

После включения экран автосэмплера должен выглядеть, как на рисунке.



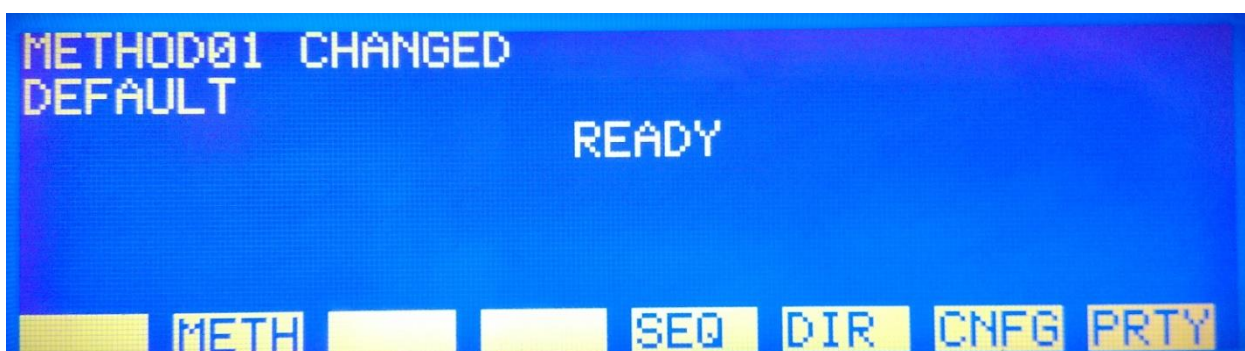
Для задания параметров работы детектора нажмите кнопку (**F2**) на клавиатуре. На экране появится меню выбора параметров.



Установите при помощи стрелок и цифровой клавиатуры необходимые параметры работы детектора.

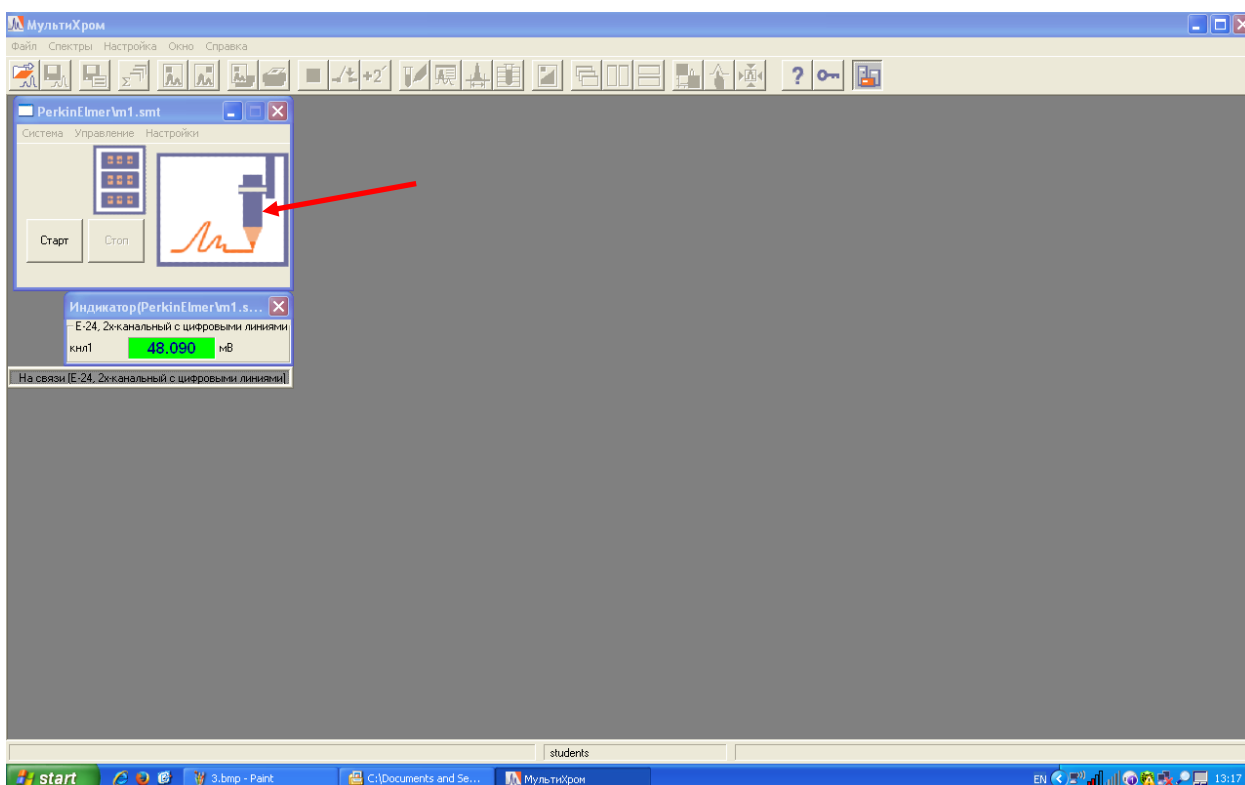


Для сохранения параметров нажмите кнопку **return**.

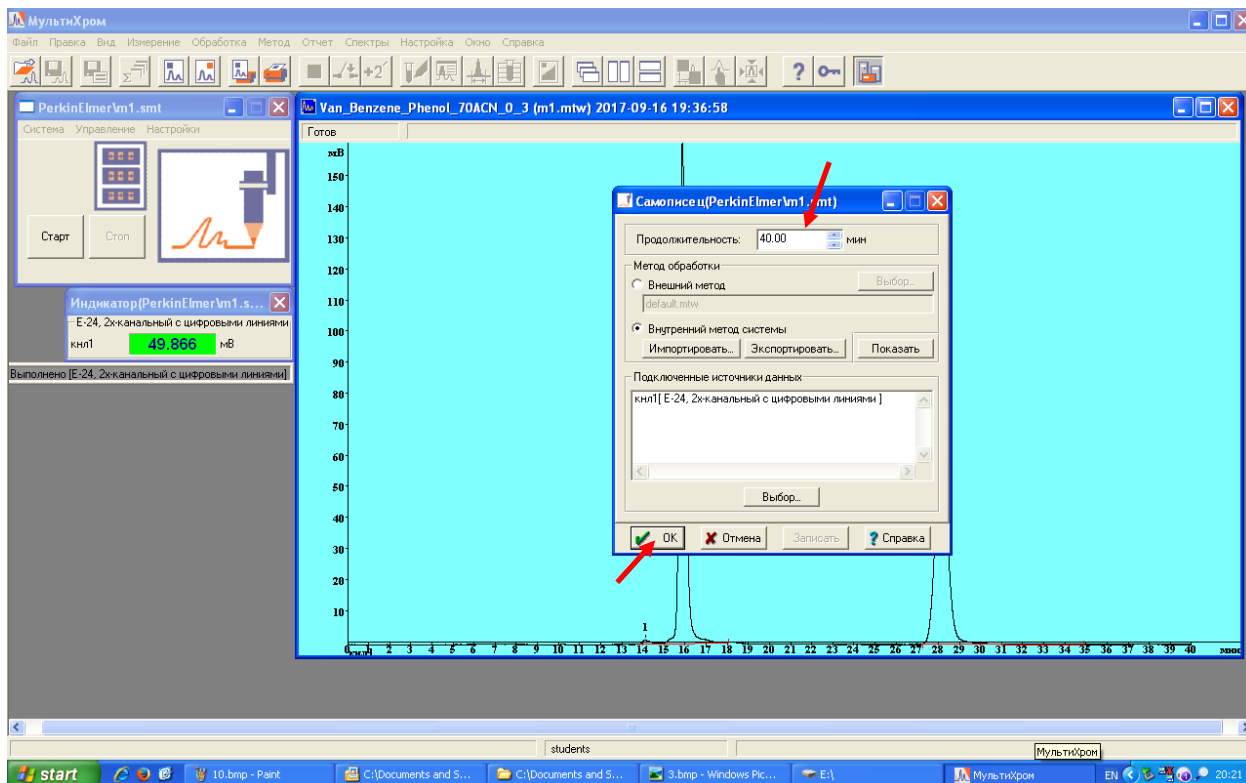


5. Задание параметров записи хроматограммы в ПО Мультихром 3.4

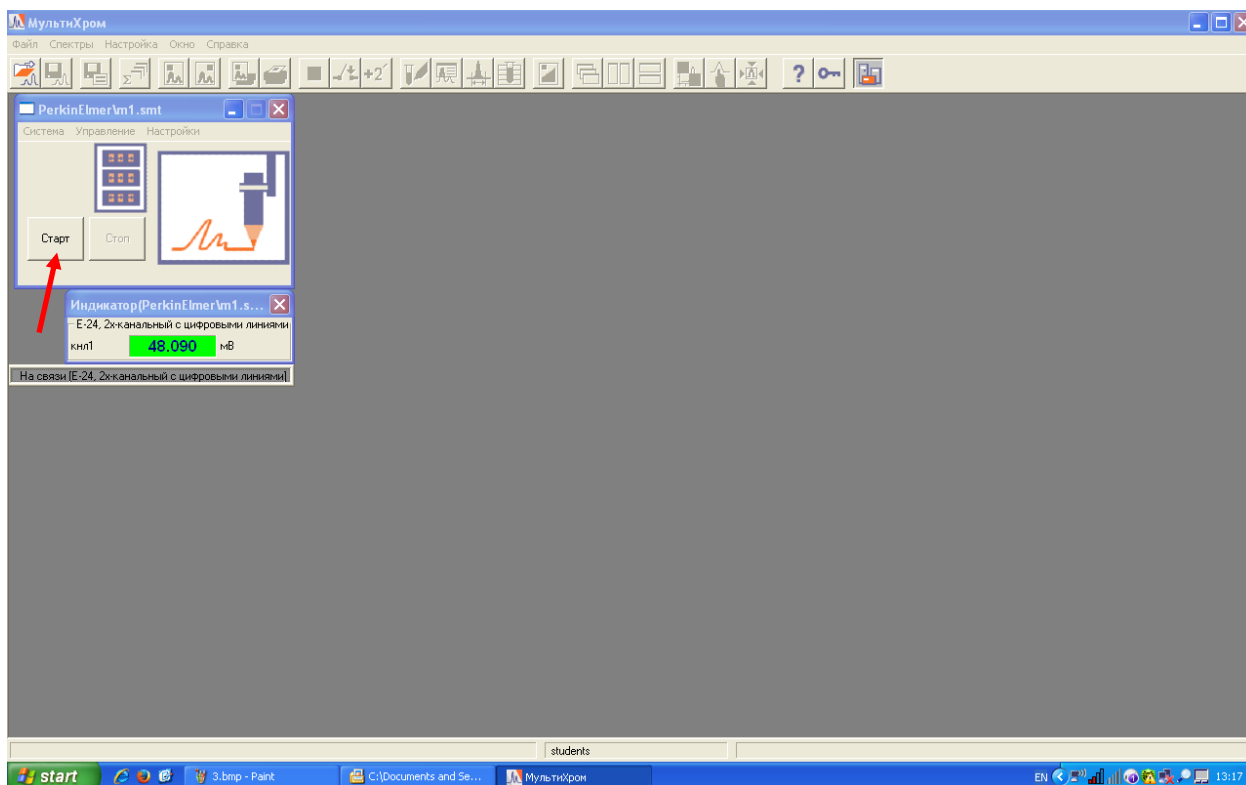
Для задания времени записи хроматограммы, нажмите на иконку самописца.

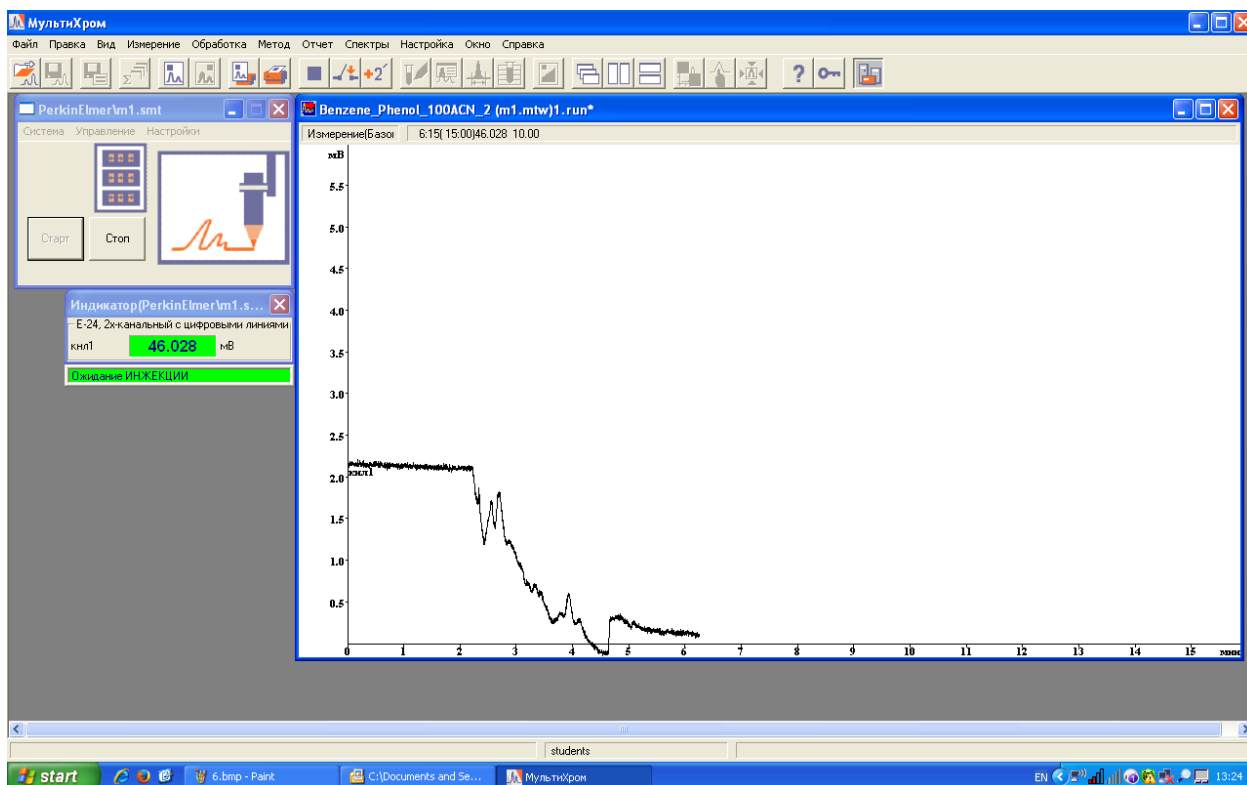
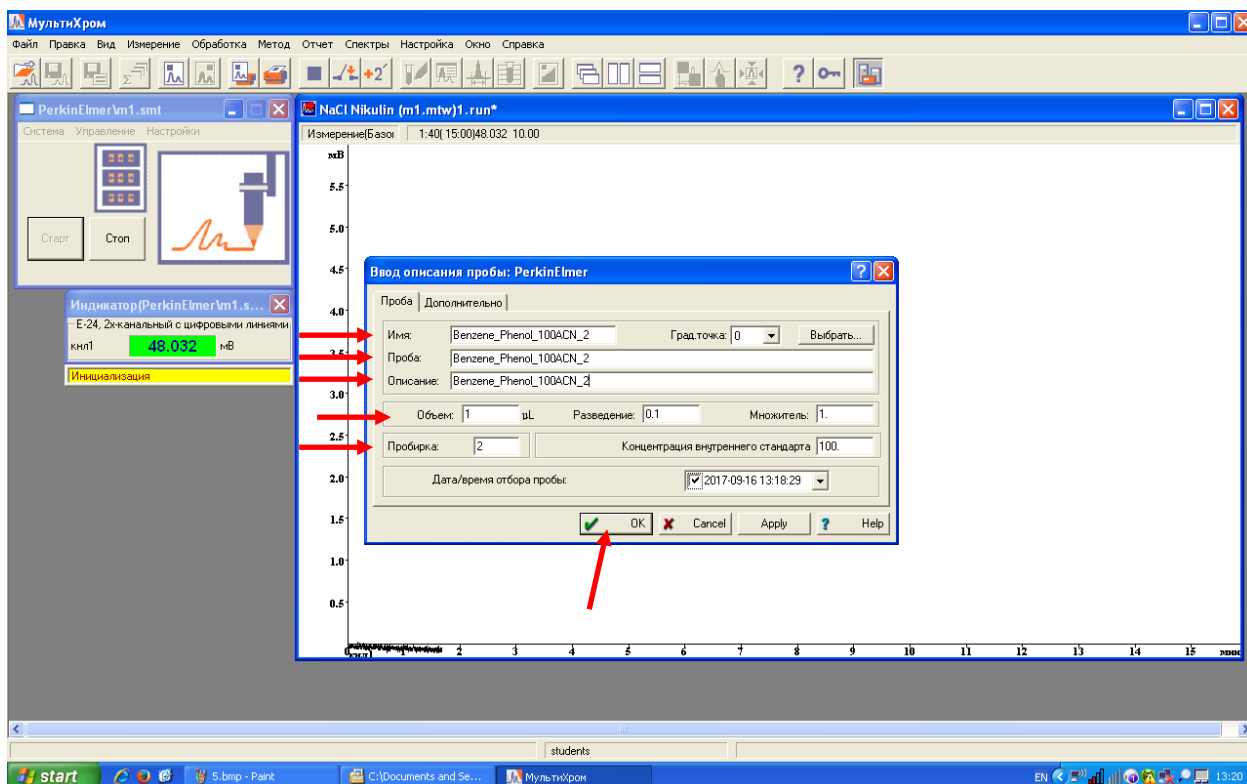


В появившемся меню задайте необходимое время и нажмите кнопку **ОК**.



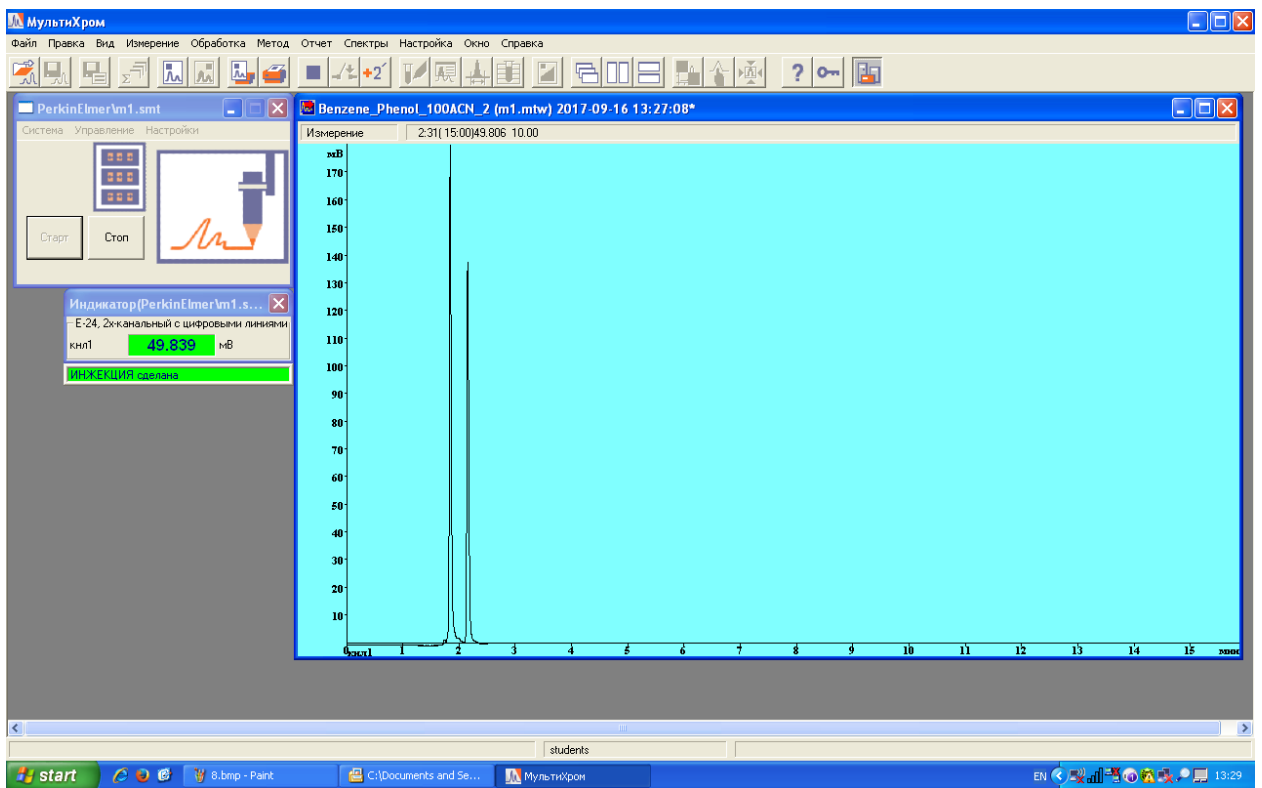
Затем нажмите кнопку **Старт**. И в появившемся меню задайте имя образца, объем пробы, номер пробирки и нажмите кнопку **ОК**.





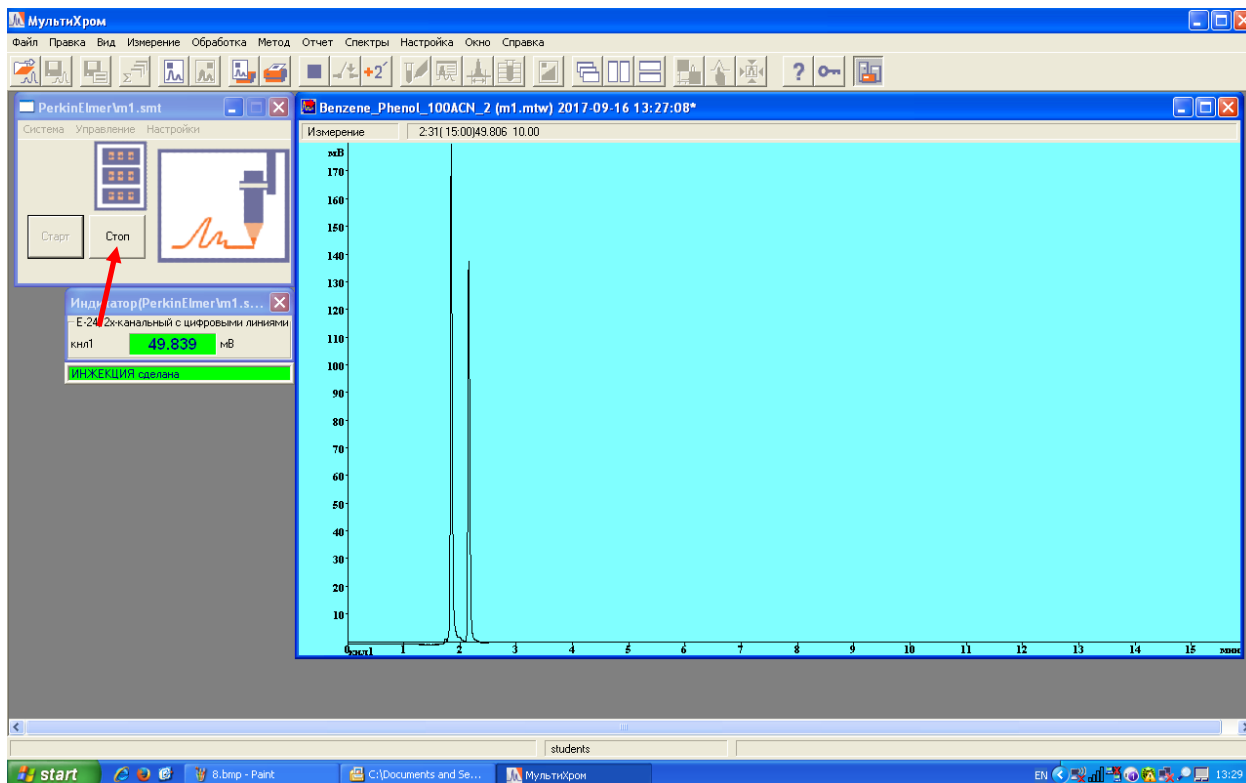
6. Запуск анализа

После конфигурации всех модулей запустите анализ кнопкой **start** на клавиатуре автосэмплера. После ввода образца в ПО МультиХром 3.4 автоматически начнется запись хроматограммы.



6. Остановка анализа

Для остановки записи хроматограммы нажмите кнопку **Стоп** в ПО МультиХром 3.4. После остановки записи отчет автоматически сохранится в папке Reports.



Для остановки насоса нажмите кнопку **stop** на клавиатуре насоса.



Для остановки детектора нажмите кнопку **stop** на клавиатуре детектора.



Перезагрузите детектор кнопкой **reset**.

