

# ВЫШЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ - БОЛЬШЕ СВОБОДНОГО ВРЕМЕНИ

## НОВАЯ СИСТЕМА ВЭЖХ СВЕРХВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ AGILENT 1290 INFINITY II

С.Жохов, К.Х.Н.  
szhokhov@gmail.com

**В** декабре 2014 года в Москве компания Agilent Technologies представила на российском рынке систему ультра-ВЭЖХ нового поколения Agilent 1290 Infinity II, впервые продемонстрированную в сентябре того же года. Agilent 1290 Infinity II - это значительно усовершенствованный вариант предыдущей системы Agilent 1290 Infinity, продолжение линейки жидкостных хроматографов Agilent 1200 LC. Система сочетает исключительную надежность, свойственную всей продукции Agilent, с передовыми технологиями, обеспечивающими максимальную эффективность анализов, широкие инструментально-приборные возможности, оптимальную работу системы в контексте всей лаборатории в целом.

Технология ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (ультра-ВЭЖХ, UHPLC), впервые введенная в коммерческое использование в 2004 году компанией Waters, вывела процессы хроматографического разделения на качественно новый уровень. В первые годы клиенты, приобретая системы ультра-ВЭЖХ, гнались за резким повышением эффективности разделения, не особенно заботясь о таких "второстепенных" вещах, как универсальность, простота использования, экономия расходных материалов. Спустя более 10 лет технология ультра-ВЭЖХ приобрела "зрелый" статус, и те факторы, на которые когда-то не обращали внимания, теперь выходят на первый план.

Именно они часто становятся решающими при выборе системы ультра-ВЭЖХ. Поэтому разработчики новой хроматографической установки Agilent 1290 Infinity II поставили перед собой задачу довести до совершенства каждую мелочь.

"Мы учитываем интересы сразу всех сотрудников лаборатории или фирмы, которая приобретает нашу систему, - рассказал вице-президент компании Agilent Technologies, генеральный менеджер отдела жидкостной хроматографии д-р Штефан Шютте (Stefan Schuette). - Ученый-хроматографист, разумеется, заинтересован в качестве результатов и максимальной эффективности хроматографического процесса. Оператор прибора ценит инструментальные

возможности, экономию времени, удобство эксплуатации. Наконец, руководителя лаборатории интересуют финансовые затраты на расходные материалы и запчасти, а также компактность устройства. Мы взяли за основу классическую систему Agilent 1290 Infinity и усовершенствовали ее сразу в трех плоскостях – с точки зрения повышения эффективности анализов, расширения инструментальных возможностей и, наконец, оптимизации работы системы как части всей лаборатории". Рассмотрим эти три аспекта подробнее.

### **МАКСИМАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНАЛИЗОВ – АБСОЛЮТНАЯ УВЕРЕННОСТЬ В РЕЗУЛЬТАТАХ**

Важнейшая характеристика хроматографического анализа – эффективность разделения, то есть минимальная ширина пиков и отсутствие их перекрывания. Для эффективного разделения система не должна иметь пустых пространств – "мертвых объемов", а объем соединительных капилляров должен быть минимальным. По сравнению с предшественником Agilent 1290 Infinity в новом приборе объемы капилляров уменьшены до минимума, а пустоты исключены вовсе.

Чаще всего "мертвые объемы" возникают при подсоединении колонки к системе. Если берется колонка стороннего производителя или даже колонка Agilent старого образца, длина капилляра, выступающего из фитинга, может оказаться неподходящей. В результате – или "мертвый объем", или неплотное соединение, а порой даже застревание капилляра в колонке. Решая эту проблему, разработчики снабдили систему универсальными фитингами серии A-Line, в которых длина капилляра легко меняется, и любую колонку можно присоединить к системе даже без минимального "мертвого объема".

Другая важная характеристика – чистота анализа, то есть отсутствие переноса остатков веществ из одного анализа в другой. Главная причина переноса – плохая промывка иглы автосамплера и ее седла. В нашей системе за счет улучшения качества промывки этих элементов удалось снизить процент переноса до ничтожного уровня – 0,0002% (2 миллионные доли). Система сконструирована так, что внутренняя поверхность иглы промывается непрерывно – через нее постоянно пропуска-



ется поток элюента. Для внешней поверхности иглы и седла предусмотрена многостадийная программа промывки тремя различными растворителями. Седло может промываться прямым и обратным потоком.

Исключительно важны точность и воспроизводимость значений времени удерживания. В каждый конкретный момент времени состав элюента и скорость потока должны быть строго определены, не меняться от анализа к анализу. Система оснащена уникальным насосом 1290 Infinity II Flexible Pump. Он обеспечивает высокопроизводительное смешивание как при низких, так и при высоких давлениях. Характеристики градиентного режима очень высокие при любой концентрации компонентов элюента от 1 до 99%. Пользователи многих других систем испытывают сложности при градиентной элюции с "пограничными" значениями одного из компонентов, ниже 5% или выше 95%, так как большинство насосов в этих областях работают нестабильно. В насосе 1290 Infinity II Flexible Pump эта проблема решена. Стабильность работы при высоких давлениях, свойственная бинарным насосам, сочетается с

универсальностью четырехканальных насосов. Данный насос позволяет готовить сложные элюэнты, смешивать три или четыре компонента.

Значительно улучшены возможности детектирования. Система 1290 Infinity II оснащена двумя диодно-матричными детекторами с прочными кюветами. Один детектор снабжен кюветой с длиной оптического пути 60 мм, второй – 37 мм. За счет комбинации двух детекторов, диапазон линейности оказывается в 30 раз шире, чем у традиционных детекторов Agilent. В десять раз снижен предел обнаружения благодаря низкому шуму, в три раза увеличена верхняя граница диапазона линейности. Кроме диодно-матричных детекторов, система оснащена оптическим детектором с двумя длинами волн, быстро переключаемыми в процессе анализа. Такой детектор может регистрировать 240 значений в секунду, что делает форму пиков максимально правдоподобной. Также имеется испарительный детектор светорассеяния (ELSD), дающий возможность определять вещества без хромофора. Его динамический диапазон расширен в 90 раз по сравнению с подобными детекторами предыдущих серий, прежде всего за счет увеличения степени линейности отклика. (Как известно, современные детекторы ELSD никогда не дают по-настоящему линейный отклик). Детектор способен работать при пониженных температурах, в случае если вещества термолabileльны.

С такими широкими возможностями детектирования можно количественно определить за один анализ многие компоненты сложных смесей, даже если их содержание различается на несколько порядков. Это исключительно важно для фармацевтической промышленности. Сейчас все более популярны препараты с небольшими активными веществами, близкими по структуре, но с сильно различным содержанием. В сфере контроля качества требуется количественно определять многочисленные примеси на фоне высоких пиков основных компонентов.

Может возникнуть резонный вопрос – не очень ли дорого покупать два диодно-матричных детектора для одной и той же системы? Как сказал Удо Хубер (Udo Huber), менеджер по методической поддержке Agilent Technologies, "лучше один раз купить два детектора, чем все время проводить по несколько анализов одного и того же образца, разбавляя и концентри-

руя. Деньги, потраченные на второй детектор, возвращаются очень быстро".

## **ШИРОКИЕ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ: УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ, ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ, ПРАКТИЧНОСТЬ**

Универсальность системы во многих отношениях обеспечивается конструкцией ее модулей. Главное новшество – термостатируемый колоночный отсек, куда можно устанавливать сразу до восьми колонок длиной от 50 до 250 мм. Колонки можно последовательно друг с другом соединять, составлять из них сложные схемы, что необходимо, например, при двумерной хроматографии. Фитинги серии A-Line позволяют быстро и надежно подключать колонки разных типов и производителей. Сам процесс подсоединения или замены колонки занимает не более полуминуты, при этом не нужен гаечный ключ или другие инструменты. Можно использовать не только ультра-ВЭЖХ-, но и обычные ВЭЖХ-колонок с любым размером гранул сорбента. Диапазон рабочих давлений расширен до 1300 бар при скорости потока до 2 мл/мин или до 800 бар при 5 мл/мин. Термостат поддерживает температуры от 4 до 110°C. Предколоночные теплообменники предусмотрены трех типов: на 1; 1,6 и 3 мкл. Процесс их подключения и замены также весьма прост.

К факторам удобства можно отнести дверцу колоночного отсека, которая при открытии фиксируется в горизонтальном положении, перпендикулярно отсеку. При необходимости она может полностью отводиться вниз (на 180°) или сниматься. В горизонтальном положении дверца может служить столиком для колонок, инструментов или соединительных кранов.

Конструкция автосамплера позволяет загружать образцы в любых микропланшетах с глубиной ячейки до 50 мм или виалах до 6 мл. Шкаф автосамплера можно заполнять контейнерами разных размеров. Для термолabileльных образцов предусмотрена система охлаждения. Инжектор оснащен петлей на 500 мкл (стандартного размера) и микропетлями на 20 мкл – нет смысла "прогонять" малые объемы образца по большой петле. Система ввода инжектора программируемая: можно автоматически разбавлять образцы, смешивать их, даже проводить дериватизацию.

Высокая производительность – это, в первую очередь, быстрота и автоматизация процессов. Существенный выигрыш во времени обеспечивает "система двойного ввода": между анализами больше не тратится время на процедуры промывки и ввода образцов. Автосамплер оснащен двумя иглами, и пока идет анализ первого образца серии, промывается вторая игла и загружается второй образец. Анализ второго образца начинается сразу же по окончании анализа первого, без перерыва. Затем тут же запускается промывка освободившейся иглы и загрузка третьего образца и т.д. При такой непрерывной организации анализов и скоростях ультра-ВЭЖХ иногда нескольких минут достаточно для исследования более десятка образцов.

Автоматизация внедрена на многих этапах хроматографического процесса. Частично автоматизирована пробоподготовка – инжектор позволяет смешивать и разбавлять образцы. Компоненты буферов элюента также можно смешивать в автоматическом режиме благодаря программе BlendAssist – одному из модулей программного обеспечения. Например, чтобы изменить содержание трифторуксусной кислоты, нужно лишь ввести команду в программу, а не готовить новые буферные растворы вручную.

Для автоматической оптимизации метода анализа служит программа Method Scouting Wizard. Она запускает многократные анализы одного образца, "перебирая" все заданные комбинации параметров разделения. Варьируется тип колонки (в систему может быть установлено до восьми различных колонок), состав буфера, температура, градиентные параметры. Например, число комбинаций из трех колонок, пяти градиентных профилей, четырех скоростей потока, трех концентраций трифторуксусной кислоты и четырех значений температуры составляет 720, и все они могут быть проверены автоматически за одну ночь. Если на каких-то этапах требуется регенерация колонок, она запускается программой в нужные моменты. Результаты самых удачных измерений выводятся на экран, и пользователь может выбрать лучший метод для разделения своего образца.

Наконец, отметим чрезвычайно удобный графический интерфейс всего программного обеспечения. Для быстрой и простой настройки последовательности предусмотрено

графическое отображение ввода проб. Отображаются все ячейки автосамплера в удобном формате: какие свободны, какие заполнены, полностью или частично. Системы, поставляемые в Россию, комплектуются программами полностью на русском языке.

## **МАКСИМАЛЬНАЯ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ ЛАБОРАТОРИИ ПРИ МИНИМАЛЬНЫХ ЗАТРАТАХ**

Руководитель лаборатории или фирмы заботится прежде всего о финансовой стороне деятельности своей организации. Стоимость одного анализа должна быть минимальной. Наибольшая доля расходов приходится на оплату труда сотрудников, значительная часть денег уходит на запчасти, расходные материалы, аренду лабораторных площадей.

Система Agilent 1290 Infinity II создавалась с учетом экономии ресурсов лаборатории. Она компактна – ширина установки всего 40 см, модули расположены несколькими ярусами один над другим. То есть не нужно выделять целый лабораторный стол. Автосамплер обладает повышенной вместимостью – в нем можно хранить до 6144 образцов в микропланшетах или до 432 в виалах емкостью 2 мл. Дополнительные хранилища образцов, занимающие место, скорее всего, не потребуются.

Уменьшение стоимости расходных материалов и обслуживания обеспечивается простотой и надежностью системы. Например, быстрое и простое присоединение колонок с помощью фитингов A-Line продлевает их срок службы. За своевременностью технического и сервисного обслуживания прибора следит программа Agilent Lab Advisor. Она заблаговременно предупреждает, какой модуль системы в какое время будет нуждаться в профилактике, а также сообщает о необходимости замены той или иной детали, даже может сделать заказ онлайн. Программа Agilent Maintenance Wizard облегчает самостоятельное техническое обслуживание системы. На всех этапах процедуры даются пошаговые видеонструкции. Значительную часть проблем оператор может устранить самостоятельно, нет никакого смысла каждый раз вызывать технического специалиста.

Рабочее время сотрудников можно экономить за счет ускорения анализов и сокращения перерывов между ними до нуля. Кроме того,

можно исключить процедуры ручной замены колонок и емкостей с буферами при смене условий эксперимента. Сейчас к системе можно подсоединить сразу восемь колонок и автоматически, без всяких манипуляций оператора, готовить буферные растворы. Это экономит не только время, но также реагенты и рабочее пространство: не нужно заранее готовить и хранить на столе несколько буферов с разным содержанием трифторуксусной кислоты и других добавок.

Система интеллектуальной эмуляции методик (ISET) заслуживает написания отдельной статьи. Отметим лишь, что это совершенно уникальная технология, позволяющая точь-в-точь воспроизводить на более новой системе 1290 Infinity II аналитические методы, разработанные на старых системах Agilent и даже на хроматографах других производителей. Очевидно, что все приборы физически отличаются друг от друга. Прежде всего, разные приборы будут показывать различные времена удерживания. Скорее всего, они будут короче на новых системах, поскольку совершенствование систем ведется с учетом требований к ускорению анализов. Следовательно, любой метод анализа может быть точно воспроизведен лишь на хроматографе того типа, для которого он был разработан. Однако передовые технологии делают возможным точный перенос старых методов на новую систему. Это исключительно важно, если метод, разработанный на старой системе, уже прошел процедуры валидации и легализации, и изменять его нельзя. Системе 1290 Infinity II можно дать команду "вести себя во всем как Agilent 1100". Она воспроизведет не только времена удерживания пиков, какими они были бы на Agilent 1100, но и дисперсии, степени размывания, перекрывания и другие параметры. Кроме более ранних систем Agilent, возможна эмуляция ряда хроматографов Waters и Shimadzu. Нужно лишь точно указать все характеристики системы, на которой был разработан эмулируемый метод. Если она имела нестандартный насос, автосамплер или какие-то другие характерные отличия, это тоже необходимо отметить в параметрах эмуляции.

Здесь, как всегда, соблюдается один из основных принципов философии Agilent Technologies: новое – это все прежде существовавшее, плюс еще нечто добавленное. То есть при приобретении новой системы никакие возможности предыдущей не теряются, а только расширяются.

Часто возникает необходимость в подготовке новых специалистов для работы с системой. Для этого в программное обеспечение введена программа eFamiliarization, которая обучает сотрудников с начальным уровнем знаний, а также помогает оператору восстановить навыки работы. Такое обучение дает гарантию, что два разных специалиста, проведя один и тот же анализ, получают абсолютно одинаковые результаты. А для тех, кто, возможно, ни разу не слышал слова "хроматография", компания Agilent Technologies проводит курсы в партнерской лаборатории на базе Аналитического центра МГУ им. М.В.Ломоносова.

Наконец, компания Agilent Technologies предоставляет возможность поэтапного усовершенствования уже существующих систем. Бывает, что приобретение всей системы 1290 Infinity II целиком – непозволительная роскошь для российского клиента, а в лаборатории уже установлена какая-то более старая система Agilent, например 1100 LC. Тогда к ней можно купить отдельно колоночный отсек или диодно-матричный детектор от новой системы. Технические специалисты компании обеспечат совместимость новых модулей с уже имеющимися, а также корректную работу всего программного обеспечения. Через какое-то время можно будет обновить другой модуль старой системы и т.д., пока она полностью не превратится в Agilent 1290 Infinity II.

В заключение отметим политику компании Agilent Technologies в отношении российского рынка. Компания имеет представительство в России, которое предоставляет консультации по вопросам подбора оптимальной комплектации оборудования, проводит запуск приборов и обучение работе на них, оказывает услуги гарантийного, послегарантийного обслуживания, услуги по квалификации и валидации систем. Сервисное обслуживание выполняется в кратчайшие сроки, хотя чаще всего оператор способен самостоятельно его произвести, руководствуясь указаниями программы Agilent Maintenance Wizard. Если клиент заключает контракт с компанией на обслуживание приобретенного оборудования, то специально под это оборудование закупается и резервируется набор необходимых запчастей, чтобы не приходилось долгое время ждать их поставки.

α