

## ТЕХНИКА КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В этой главе мы познакомимся с конструкциями колонок и аппаратурой как для жидкостной хроматографии при низком давлении (до 5 атм), так и для ЖХВД, а также с некоторыми техническими приемами, общими для всех методов колоночной хроматографии, разбору которых посвящены следующие пять глав. Своеобразная техника и аппаратура для ТСХ описаны в последней главе.

### ХРОМАТОГРАФИЯ ПРИ НИЗКОМ ДАВЛЕНИИ

В основной комплект приборов для проведения обычного хроматографического эксперимента при низком давлении (рис. 18), помимо самой колонки, входят перистальтический насос, денситометр, регистратор и коллектор фракций. Рассмотрим последовательно варианты конструкций и особенности эксплуатации этих приборов, а также некоторых других вспомогательных устройств. Это рассмотрение будет дополнено краткими сведениями о наиболее популярных приборах каждого типа, серийно выпускаемых различными фирмами в 1983 г.

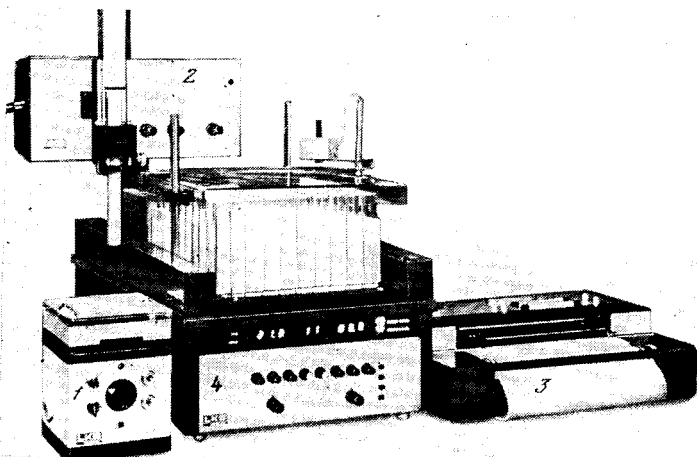


Рис. 18. Хроматографический комплект приборов фирмы «ЛКВ» (Швеция)  
1 — перистальтический насос; 2 — денситометр; 3 — регистратор; 4 — коллектор фракций

## ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ КОЛОНКИ

### Колонки, изготовленные в лаборатории

Два простейших варианта таких колонок изображены в разрезе на рис. 19. Слева представлена колонка для препаративного варианта хроматографии, без термостатирующей рубашки. В лабораторной стеклодувной мастерской несложно изготовить такую стеклянную колонку диаметром до 8 см и длиной до 1,5 м. Сверху колонка снабжена стандартным шлифом № 14 или № 29, куда вставляется шлифованная пробка с капельницей. Последняя снабжена оливой малого диаметра, на которую можно надеть трубочку из силиконовой резины, куда вставляется тонкая (1—2 мм) полиэтиленовая или тефлоновая трубка от насоса. На нижний конец капельницы целесообразно надеть с некоторым перекосом кусочек полиэтиленовой трубочки так, чтобы при установке пробки на место трубочка почти касалась стенки колонки. Этим предотвращается взмучивание верхнего слоя сорбента при падении капли. Верхнюю половину поверхности шлифа смазывают силиконовой смазкой, но так, чтобы смазка не попадала внутрь колонки. В момент установки в гнездо пробку немного проворачивают. Если шлиф хорошо притерт, слой смазки должен быть прозрачным. Герметичность посадки пробки следует проверять перед каждым опытом — при неработающем насосе жидкость из колонки не должна вытекать. В более простом варианте шлифованную стеклянную пробку можно заменить на резиновую.

В нижнюю часть колонки заправляется стеклянный фильтр. Чтобы не забиваться, его поры должны быть заведомо меньшего размера, чем гранулы сорбента. Вместе с тем нежелательно, чтобы фильтр представлял собой большое сопротивление току элюента. Для сорбентов, используемых при обычной хроматографии низкого давления, с гранулами не мельче 30 мкм в поперечнике подходит стеклянный фильтр № 3. Однако он может постепенно забиваться, если используется сорбент, засоренный «пылью», образующейся при его истирании. Во избежание этого не следует пренебрегать описанной ниже операцией «отмучивания» сорбента. Следует также помнить о том, что стеклянный фильтр сорбирует некоторое количество белка или нуклеиновой кислоты. С этой точки зрения в качестве фильтров следует предпочесть полиамидные (найлон) или тефлоновые пористые пластинки. Однако колонку в этом случае придется делать сборной, что значительно усложняет ее конструкцию. Такие фильтры используются в продажных фирменных колонках.

Под фильтром, при переходе к сливной трубке малого диаметра образуется коническая полость. При изготовлении колонки надо стремиться к тому, чтобы объем этой полости был минимальным, так как в ней может происходить смешивание близко идущих фракций. На сливной трубке имеется такая же, как на пробке, олива для трубочки из силиконовой резины, куда вставляется тонкая трубка, идущая к денситометру. Резиновую трубочку удобно пережимать винтовым зажимом, «запирая» таким образом выход из колонки.

Иногда на сливную трубку для этой цели монтируют стеклянный припаянный кран, но лучше так не делать, поскольку кран может подтекать, а смазывать его рискованно из-за опасности попадания смазки в элюент.

Справа на рис. 19 изображен разрез колонки для аналитических опытов, снабженной термостатирующей рубашкой. Конструкция самой колонки точно такая же, и сверху к ней припаивают гнездо нормального шлифа № 14, хотя сама колонка может быть диаметром 5 мм (для более тонких колонок проще надеть резиновую переходную трубочку прямо на колонку).

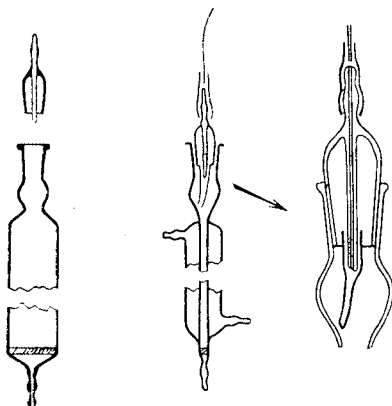


Рис. 19. Хроматографические колонки, изготовленные в лаборатории

Для проведения хроматографии на холоду или при фиксированной температуре на колонку напаяют (как можно ближе к фильтру и гнезду пробки) термостатирующую рубашку. Охлаждающую или термостатированную воду насосом подают к нижнему выводу рубашки.

Для выполнения простейших операций очистки препарата (например, белка от радиоактивных «предшественников») нередко в качестве маленькой колонки используют пастеровскую или обычную пипетку, а еще чаще — баллончик от шприца на 1—2 мл. Вместо фильтра в выходной канал такой «колонки» помещают комочек хорошо промытой стеклянной ваты.

### Фирменные колонки

Для простых хроматографических опытов фирма «Bio-Rad» предлагает набор относительно дешевых колонок типа «Econo-columns». Это стеклянные трубки диаметром от 5 до 25 мм и длиной от 4 до 170 см. На них надевают съемные полипропиленовые наконечники, снабженные люэровскими конусами. Нижний наконечник несет в себе диск из пористого полиэтилена. Есть варианты таких колонок, оснащенные термостатирующей рубашкой и даже адапторами с одного или обоих концов колонки. С помощью адаптора (плунжера) столб сорбента внутри колонки, даже заполненной лишь частично, можно ограничить пористой пластинкой и плоской конической камерой минимального объема не только снизу, но и сверху, со стороны подачи элюента. Это создает существенные удобства для внесения на колонку раствора препарата и улучшает условия элюции, особенно градиентной, когда в жидкости, находящейся над поверхностью сорбента, возможно перемешивание разных частей градиента. При ослабленной верхней гайке 6 (рис. 20) адаптор можно подвинуть в любое положение, вплоть до касания фильтра 2 с поверхностью сор-

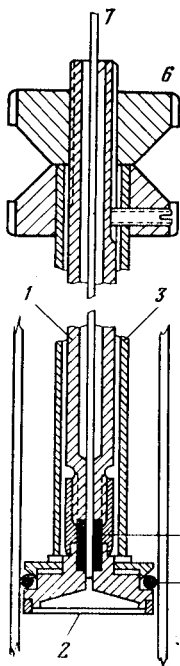


Рис. 20. Конструкция адаптера

1 — корпус; 2 — фильтр; 3 — прижим; 4 — резиновое уплотнительное кольцо; 5 — уплотнение трубки; 6 — гайка прижима; 7 — тефлоновая трубка

бента. Затем, затягивая гайку, заставляю резиновое уплотнительное кольцо 4 раздаться по диаметру. При этом положение адаптера фиксируется и внутренний объем колонки оказывается герметизированным. С помощью двух адаптеров можно осуществить элюцию колонки снизу вверх (восходящим током жидкости), что дает свои преимущества, например, при работе с очень мягкими матрицами.

Дорогие фирменные колонки оснащены устройствами для более совершенной фиксации и уплотнения наконечников, что позволяет подавать в них элюент под избыточным давлением 1—2 атм, а также запорными кранами иглычатого типа, съемными термостатирующими рубашками и др.

Популярны, особенно для гель-фильтрации, колонки фирмы «Pharmacia». Новая серия С включает колонки трех диаметров (1,0; 1,6 и 2,6 см) и пяти различных длин — от 10

до 100 см, что при наличии адаптеров позволяет выбрать любой объем сорбента — от 1 до 500 мл. В стандартном обозначении колонок этой фирмы, например  $S_{16/70}$ , первая цифра указывает диаметр колонки в миллиметрах, а вторая — длину в сантиметрах. Колонки с термостатирующей рубашкой обозначаются индексом «IC». Аналогичного типа колонки производит фирма «LKB».

Некоторые фирмы выпускают толстостенные стеклянные колонки с уплотнениями, рассчитанными на давление до 30 атм. Так, фирма «Beckman» (ранее «Altex») предлагает широкий ассортимент таких колонок с диаметрами 2, 3, 6, 9, 15 и 25 мм (последние два диаметра рассчитаны на давления 20 и 7 атм соответственно), длиной от 5 до 100 см. Аналогичные параметры имеют колонки фирмы «Applied Science». Из дальнейшего будет видно, что такого рода колонки, рассчитанные на «средние» давления, представляют сейчас особый интерес в свете новых тенденций развития высокоэффективной хроматографии биологических макромолекул. Фирма «Pierce» для использования в аминокислотных анализаторах выпускает термостатируемые стеклянные колонки («Chromato Flo», серия E) диаметром 3 мм и длиной от 10 до 40 см, снабженные адаптерами и рассчитанные на давление до 70 атм. Эта же фирма производит и обычные колонки низкого давления («Chromato Flo», серия A) диаметром от 9 до 50 мм.

Как уже указывалось, разрешающая способность хроматографического процесса существенно зависит от однородности размеров гранул сорбента, поэтому в особо ответственных случаях имеет смысл рассортировать сорбент так, чтобы отобрать фракцию гранул, размеры которых лежат в более узком интервале, чем у исходного продажного материала. Для этой цели удобно воспользоваться простой системой (рис. 21). Поднимая или опуская сосуд 1, можно изменять общую объемную скорость течения воды через коническую делительную воронку 3. По мере расширения конуса линейная скорость подъема воды в нем уменьшается; в соответствии с градиентом этой скорости материал сорбента расслаивается по высоте воронки на фракции гранул различного размера. Постепенно увеличивая напор воды, можно через сливную трубку 4 отбирать одну такую фракцию за другой.

Если в этом нет нужды, то следует по крайней мере позаботиться о том, чтобы удалить «пыль» — мелкие обломки материала сорбента («fines»), которые могут засорять промежутки между гранулами. Результатом засорения явится не только замедление течения элюента через колонку, но и неоднородность этого течения, что, как мы знаем, приведет к размыванию хроматографических зон. Мелкие обломки гранул могут образоваться в ходе перемешивания суспензии сорбента при его промывке, а также неизбежно возникают вследствие истирания при транспортировке сорбента в виде сухого порошка (в частности, и по этой причине многие сорбенты сейчас поставляют в виде суспензий).

Удаление мелких частиц осуществляют с помощью операции «отмучивания». Разбавленную суспензию набухшего, промытого и переведенного в нужный буфер (см. ниже) сорбента заливают доверху в мерный цилиндр, объем которого в 5—6 раз больше, чем объем упакованного влажного сорбента, и дают ему осесть до того момента, когда между слоем сорбента и мутной жидкостью над ним обозначится резкая граница. Гранулы смолы или сефадексов оседают относительно быстро — за несколько минут (в зависимости от их среднего размера), а целлюлоза — медленнее (за 10—30 мин). Жидкость над осадком вместе со взвешенными в ней мелкими частицами отсасывают и отбрасывают. Снова дополняют цилиндр буфером, осторожно палочкой взмучивают осадок по всему объему цилиндра и повторяют описанную операцию до тех пор (3—5 раз), пока жидкость над только что образовавшимся осадком не будет совершенно прозрачной. Затем выжидают еще некоторое время (до полного оседания слоя сорбента), измеряют его высоту линейкой и отсасывают буфер — на этот раз не полностью, а до такого уровня, чтобы слой жидкости составлял половину высоты осадка. Такое соотношение при взмучивании позволяет получить кашицу («slurry»), консистенция которой наиболее удобна для заливки в колонку.

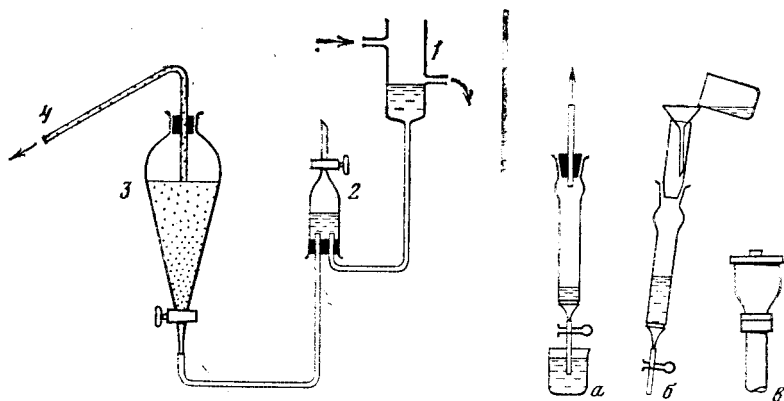
Подготовка к набивке хорошо промытой колонки состоит в том, что конец сливной трубки погружают в стакан с буфером, а в гнездо

верхнего шлифа вставляют пробку с трубкой, которую присоединяют к водоструйному насосу, после чего на короткое время отпускают зажим на сливной трубке. При этом жидкость энергично всасывается в колонку снизу через фильтр (рис. 22, а), чем достигается удаление воздуха из фильтра. Теперь можно пробку выпнуть, а излишку жидкости дать вытечь, чтобы над фильтром остался слой, толщина которого примерно равна диаметру колонки. В гнездо шлифа устанавливают удлинительную трубку такого же диаметра, как колонка, но вполосину более короткую, а в нее вставляют воронку (рис. 22, б). Фирма «Pharmacia» для этой цели поставляет специальный резервуар плавного расширяющегося профиля, который крепится на верхний наконечник фирменной колонки. Объем его должен быть не меньше половины объема колонки (рис. 22, в).

Кашицу сорбента осторожно взбалтывают и отбирают в мерный стакан объемом, равный 1,5 объемам предполагаемой рабочей части колонки. Колонку вместе с удлинительной трубкой слегка наклоняют и, еще раз взболтав кашицу в стакане, выливают сразу все его содержимое в воронку или резервуар. Кашица должна стекать по стенке колонки: в случае образования пузырей воздуха они поднимутся через не слишком густой слой (жидкая суспензия нехороша тем, что во время заливки в ней могут образоваться вихревые потоки, приводящие к рассортировке гранул сорбента по размерам). После этого колонку устанавливают вертикально и на место воронки в верхний конец удлинительной трубки вставляют пробку с трубкой, присоединенной к насосу (резервуар плотно закрывают крышкой с такой же трубкой).

Прежде чем освободить зажим на сливной трубке, надо подумать о том, можно ли допустить протекание через колонку жидкости со скоростью, задаваемой перепадом ее уровней в удлинительной трубке (или резервуаре) и на выходе из колонки, — такая ситуация возникает в момент отсоединения насоса от удлинительной трубки. Для мягких сортов сефадекса (см. гл. 4) это может оказаться недопустимым. Тогда на сливную трубку надо надеть так называемую «защитную петлю» (рис. 23, а). Теперь гидравлический напор при свободном вытекании жидкости будет определяться расстоянием  $H$ , которое можно выбрать произвольно. Заметим попутно, что термин «защитная петля» употребляют и для обозначения системы, показанной на рис. 23, б. Ее назначение совсем иное — предохранить колонку от обсыхания в ходе элюции, если весь запас элюента в колбе будет израсходован (например, при элюции в почное время). После того как жидкость в левом колене трубки опустится до уровня А, истечение жидкости из колонки прекратится.

Решив вопрос о защитной петле, можно освободить зажим на сливной трубке и включить насос для подачи в удлинительную трубку буфера с рабочей скоростью элюции. В таком режиме следует прокачивать буфер до тех пор, пока уровень сорбента не опустится до своего почти окончательного положения в колонке. После этого можно отсоединить насос и дать возможность буферу из удлинительной трубки полностью войти в колонку, а удлинительную трубку (или

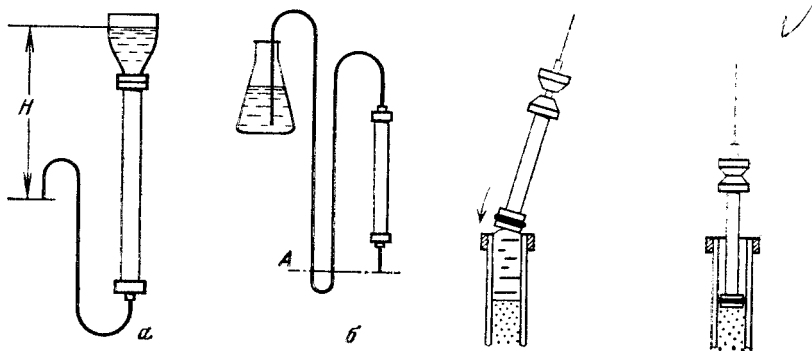


**Рис. 21.** Система для фракционирования гранул сорбента по размерам

1 — сосуд с неизменным уровнем воды; 2 — ловушка для воздуха; 3 — делительная воронка; 4 — трубка для сбора фракций

**Рис. 22.** Заполнение хроматографической колонки

а — удаление воздуха; б — заливка «кашницы» сорбента через удлинительную трубку; в — резервуар для заливки колонки фирмы «Pharmacia»



**Рис. 23.** Защитные петли для уменьшения скорости течения элюента через колонку (а) и для предотвращения обсыхания колонки (б)

**Рис. 24.** Установка адаптора в колонку

резервуар) снять. Теперь можно, перекрыв слив, установить на место верхнюю пробку колонки или адаптор. При установке последнего необходимо принять меры предосторожности против возможного задержания пузырьков воздуха на поверхности его фильтра. Для этого следует поступать так, как схематически показано на рис. 24. Колонку заполняют доверху буфером, ослабляют зажим уплотнительной резинки на адапторе и начинают погружать его в наклонном положении так, чтобы воздух вышел из клиновидного зазора между фильтром и жидкостью. Потом адаптор осторожно опускают до уровня

сорбента. В конце этого движения понемногу зажимают резинку, с тем чтобы заставить жидкость заполнить трубку адаптора. Когда фильтр коснется сорбента, резинку затягивают окончательно, фиксируя адаптор в колонке. Смонтированную таким образом колонку уравнивают током буфера на рабочей скорости в течение нескольких часов, пропуская не менее двух полных объемов колонки. Если за это время уровень сорбента несколько понизится, то адаптор, ослабив резинку, подвигают к нему снова и закрепляют в окончательном положении.

Описанная процедура набивки колонки пригодна для любого гранулированного сорбента. Волокнистую целлюлозу, ввиду ее упругости, лучше вносить последовательно, порциями, поднимаясь с каждой порцией примерно на 8 см по высоте колонки. Следует приготовить более густую кашицу с соотношением 1,25 : 1 вместо 1,5 : 1, заполнить ею шприц, снабженный длинной трубкой, и через нее выдавить кашицу прямо на дно колонки. Затем необходимо долить в колонку буфер и прокачать его в течение 20—30 мин со скоростью, превышающей рабочую скорость элюции (например, 50 мл/см<sup>2</sup>·ч). После этого колонку открывают, дают буферу стечь так, чтобы над сорбентом остался слой толщиной около 2 мм, из шприца вносят новую порцию целлюлозы, палочкой перемешивают ее с верхней частью предыдущей порции и снова прокачивают буфер, как указано выше, и так далее до самого верха колонки.

Короткую колонку (длиной до 20 см) можно набить на  $\frac{3}{4}$  ее высоты без помощи удлинительной трубки. Прямо в колонку можно залить более густую, чем описано выше, кашицу сорбента (1,15 : 1), затем сразу же ввести адаптор и начать прокачку буфера, в ходе которой сорбент оседает до своего окончательного уровня.

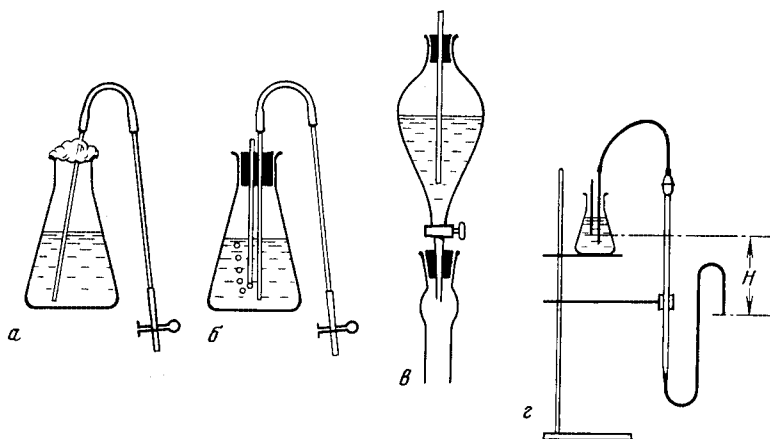
Колонки малого диаметра удобно заполнять в перевернутом положении, засасывая жидкую кашицу сорбента с помощью водоструйного насоса. Колонка заполняется за несколько секунд. После этого можно зажать трубку, ведущую к насосу, вынуть колонку из стакана и перевернуть. Излишек сорбента с верхнего конца колонки отсасывают, а далее, как обычно, уравнивают колонку прокачкой буфера с рабочей скоростью элюции.

## **РЕЗЕРВУАРЫ ДЛЯ ЭЛЮЕНТА. СМЕСИТЕЛИ ГРАДИЕНТА**

### **Изократическая элюция**

В качестве резервуара для элюента проще всего использовать коническую колбу или бутылку с изогнутой полиэтиленовой трубкой (рис. 25, а), на конец которой надевают силиконовую резинку. В трубку с помощью шприца засасывают жидкость из колбы так, чтобы образовался сифон, и затыкают ее оплавленным кусочком стеклянной палочки. Горловину колбы во избежание попадания пыли в элюент следует закрыть ватным тампоном или фольгой.





**Рис. 25.** Резервуары для элюента при изократической элюции

*a* — обычная колба, закрытая ватным тампоном от пыли; *б, в* — варианты колбы Мариотта; *г* — определение гидравлического напора в системе с защитной петлей и колбой Мариотта

Если элюция колонки осуществляется без насоса («самотеком»), то при снижении уровня жидкости в колбе будет уменьшаться гидростатический напор, а следовательно, и скорость элюции. Чтобы избежать этого, можно воспользоваться колбой Мариотта (рис. 25, б). Она отличается от обычной лишь тем, что в ее горловину плотно вставлена резиновая пробка, в которой закреплена еще одна (дренажная) трубка, немного не достающая до дна колбы и открытая в атмосферу. При вытекании элюента из колбы Мариотта над его уровнем начнет создаваться разрежение, уровень жидкости в дренажной трубке будет снижаться, а затем через нее в свободный объем над элюентом пузырьками начнет поступать воздух. Этому моменту отвечает равенство суммы давлений слоя элюента и разреженного воздуха над ним атмосферному давлению, которое будет сохраняться до тех пор, пока уровень элюента не опустится до конца дренажной трубки. Таким образом, колба Мариотта ведет себя как открытый сосуд, в котором уровень жидкости остается неизменным на высоте нижнего конца дренажной трубки. От этой высоты в замкнутой гидравлической системе, куда входит и колонка, следует отсчитывать перепад уровней, создающий гидравлический напор  $H$  (рис. 25, г). Когда система замкнута, колбу Мариотта (так же как открытую колбу) можно опускать или поднимать, изменяя величину напора  $H$  и скорость элюции. Можно опускать колбу и ниже верхнего конца колонки. Замкнутая гидравлическая система работает как сифон. В этом случае особенно важно быть уверенным в герметичности посадки пробки в гнездо колонки. На рис. 25, в показан другой популярный вариант колбы Мариотта, в котором используется делительная воронка, установленная непосредственно на колонку.

## Градиентная элюция

О преимуществах элюции непрерывно изменяющейся концентрацией соли (или pH) было сказано в гл. 1. Технически «непрерывный градиент» проще всего осуществить, используя систему двух цилиндрических сообщающихся сосудов (рис. 26, *a*; *б* — упрощенный вариант с обычными стаканами). Сосуды следует прикрыть фольгой или (неплотно) крышками, с тем чтобы уменьшить испарение воды в процессе элюции. Систему в целом обычно называют «смесителем градиента». Термин не очень удачен, так как действительно смесителем служит только сосуд *B*, откуда элюент поступает на колонку. Жидкость в смесителе перемешивают с помощью магнитной мешалки. Сосуд *A* служит резервуаром, из которого жидкость с иным, чем в смесителе, значением фактора элюции поступает в сосуд *B*. Чаще всего таким фактором является повышенная концентрация буфера или соли. Обозначим первоначальные концентрации вещества в резервуаре и смесителе соответственно символами  $C_A$  и  $C_B$ , исходные объемы жидкостей в них —  $V_A$  и  $V_B$ , а площади сечения самих сосудов —  $S_A$  и  $S_B$ . Пусть  $V$  обозначает текущий объем, поступивший из смесителя в колонку с момента начала элюции, а  $C_V$  — концентрацию на выходе системы после вытекания из нее объема  $V$ . Интегрирование простого дифференциального уравнения равновесного течения жидкости в этой системе дает следующую зависимость  $C_V$  от  $V$ :

$$C_V = C_A - (C_A - C_B) \left( 1 - \frac{V}{V_A + V_B} \right)^{\frac{S_A}{S_B}}. \quad (25)$$

При одинаковом сечении сосудов ( $S_A = S_B$ ) формула упрощается:

$$C_V = C_B + (C_A - C_B) \frac{V}{V_A + V_B}. \quad (26)$$

Она описывает линейный закон зависимости  $C_V$  от  $V$ , т. е. «линейный градиент» элюции. В момент начала элюции, когда  $V = 0$ ;  $C_V = C_B$ , а к моменту одновременного опорожнения обоих сообщающихся сосудов, когда  $V = V_A + V_B$ ,  $C_V = C_A$ .

Если диаметр резервуара больше, чем у смесителя, т. е.  $S_A > S_B$ , то концентрация раствора в смесителе вначале нарастает быстрее, чем по линейному закону, а в конце элюции тоже оказывается равной  $C_A$ , как видно из формулы (25) при  $V = V_A + V_B$ . Отсюда следует, что форма градиента будет выпуклой по отношению к оси  $V$  (рис. 27). Аналогично, если диаметр резервуара меньше, чем диаметр смесителя ( $S_A < S_B$ ), то градиент будет вогнутым.

Начинают заполнение смесителя градиента с резервуара, перекрыв канал, соединяющий два сосуда. Потом пропускают немного жидкости в канал, так чтобы она показалась в сосуде смесителя, а затем уже заполняют и его. На рис. 28 показана схема «принудительного» образования линейного градиента с помощью трехканального перистальтического насоса. Для того чтобы жидкость из смесителя *B* вытекала со скоростью, вдвое большей, чем скорость поступления в него жидкости из резервуара *A* (это эквивалентно

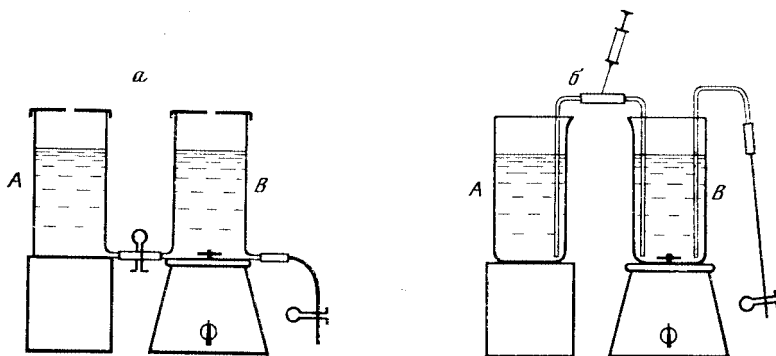


Рис. 26. Смесители градиента (см. текст)

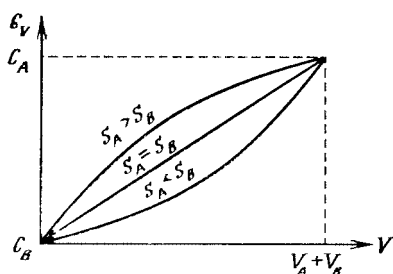


Рис. 27. Форма градиента концентрации элюента (см. текст)

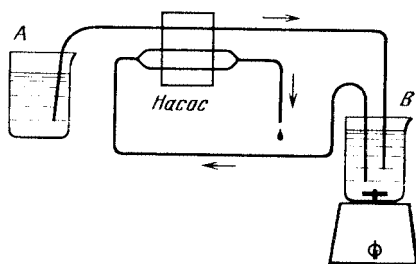


Рис. 28. Схема «принудительного» образования линейного градиента с помощью насоса

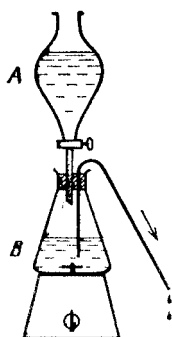


Рис. 29.

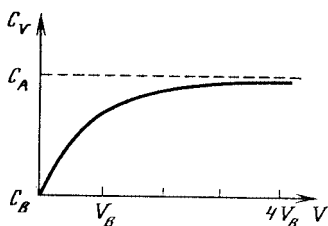


Рис. 29. Образование экспоненциального градиента элюции

Рис. 30. Форма экспоненциального градиента концентрации элюента (см. текст)

сохранению равенства уровней в сообщающихся сосудах), откачка из смесителя идет через два соединенных параллельно канала насоса.

В системе, изображенной на рис. 29, объем жидкости в смесителе *B* остается неизменным: из резервуара *A* в него втекает столь-

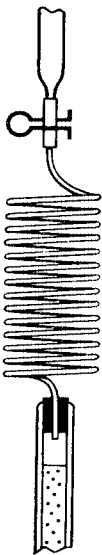


Рис. 31. Спираль для сохранения предварительно созданного градиента концентрации элюента при элюции микроколонки

ко же жидкости, сколько вытекает в колонку (то же самое произойдет, если закрыть пробкой смеситель в системе сообщающихся сосудов). В этом случае закон изменения  $C_V$  описывается следующей формулой:

$$C_V = C_A - (C_A - C_B) e^{-\frac{V}{V_B}}. \quad (27)$$

Поскольку  $e$  — основание натуральных логарифмов, создаваемый градиент называют экспоненциальным. Отметим, что в выражение (27) не входит начальный объем жидкости в резервуаре  $V_A$ . Этот объем не влияет на характер градиента, лишь бы его хватило на проведение хроматографического эксперимента (впрочем, сосуд  $A$  можно пополнять по ходу элюции). Величина  $C_V$  приблизится к  $C_A$  только после того, как через колонку пройдет объем жидкости, в несколько раз больший, чем объем смесителя, т. е. при  $V \gg V_B$  (рис. 30). При  $V = V_B$   $C_V \approx C_B + 0,63 (C_A - C_B)$ .

Если необходимо задать сложный закон изменения концентрации элюента в ходе элюции (градиент произвольной формы), то можно воспользоваться одним из продажных приборов, где профиль градиента вырезают из специальной бумаги в виде шаблона, вдоль которого затем перемещается следящий фотоэлемент. Положение фотоэлемента задает с помощью двух клапанов соотношение периодов попеременной подачи в смеситель жидкости из двух сосудов. Этим соотношением определяется концентрация раствора, поступающего на колонку. Фирма «Gilson» (Франция) поставляла такой прибор под торговым названием «Mixograd», фирма «LKB» (Швеция) — под названием «Ultrograd». Сигналом от датчика, связанного с денситометром, можно остановить продвижение фотоэлемента вдоль профиля градиента на время выхода пика вещества из колонки. Пик элюируется изократически, после чего подача градиента возобновляется.

Градиент малого объема (в несколько миллилитров) можно предварительно ввести в спираль, скрученную из полиэтиленовой трубочки диаметром 1—2 мм и длиной в несколько метров, отводя в нее часть жидкости, вытекающей из смесителя градиента большего объема. В ходе элюции микроколонки этот градиент выдавливают из спирали гидравлическим напором; в тонкой и длинной спирали градиент не смешивается (рис. 31). В спирали можно заготовить и последовательность различных растворов для элюции ступенчатым градиентом.

## ВНЕСЕНИЕ ПРЕПАРАТА В КОЛОНКУ

Исходный препарат в большинстве случаев вносят на хроматографическую колонку растворенным в том же буфере, каким уравновешена сама колонка. Перевести препарат в этот буфер можно диализом или гель-фильтрацией. Надо проследить за тем, чтобы раствор препарата был прозрачен, т. е. свободен от частиц осадка или пыли. При необходимости его следует осветлить центрифугированием или отфильтровать.

В открытую колонку (без адаптора) препарат вносят вручную из пипетки. Начинают с того, что спускают жидкость из колонки так, чтобы открылся (но не начал обсыхать!) слой сорбента. Затем сливную трубку зажимают. Раствор препарата осторожно, чтобы не взмутить сорбент, заливают по стенке колонки, начиная от расстояния в 1 мм над поверхностью сорбента и постепенно вместе с уровнем раствора препарата продвигая кончик пипетки вверх по стенке. После того как весь объем препарата внесен в колонку, сливную трубку освобождают от зажима и дают слою препарата войти в сорбент до того момента, когда его поверхность снова обнажится. Так же, как описано, вносят объем элюента, равный объему препарата, а затем спускают его в сорбент. Такую промывку стенок колонки целесообразно повторить еще раз. После этого заливают (так же) некий объем элюента (на высоту 1—2 см) и вставляют верхнюю пробку с капельницей. Слой свободного элюента предназначен для того, чтобы обеспечить образование некоторого разрежения над сорбентом, необходимого для всасывания жидкости из резервуара, если он располагается ниже верха колонки при элюции без насоса (образование сифона), или для предотвращения обнажения верхнего слоя сорбента при неработающем насосе и открытом сливе из колонки (в первый момент после открывания слива из колонки вытекает немного жидкости, затем, если система герметична, вытекание прекращается). Вместе с тем следует иметь в виду, что в слое свободного элюента над сорбентом происходит перемешивание градиента, поэтому в случае градиентной элюции высота этого слоя должна быть минимально необходимой. После того как внесение препарата и подготовка колонки закончены, можно присоединить резервуар или насос, открыть сливную трубку и начать элюцию.

В некоторых случаях в раствор препарата добавляют сахарозу и вносят этот раствор под слой свободного элюента, как при электрофорезе в вертикальных трубках. Как правило, в этом нет необходимости.

Особенно удобно и просто вносить раствор препарата в колонку с адаптором. Препарат, например из шприца, вносят прямо через трубочку адаптора. Он поступает сначала в плоскую коническую полость последнего, а затем через фильтр — равномерно на всю поверхность сорбента. Вслед за раствором препарата в трубочку адаптора подают элюент от насоса или из резервуара и прямо начинают элюцию. Однако в этой простоте кроется один «подводный

камень». Ни в коем случае нельзя допустить попадания в трубочку адаптора пузырька воздуха, который под давлением идущей за ним жидкости доходит до конической полости адаптора и там застревает. В результате часть поверхности фильтра оказывается недоступной для жидкости, однородность распределения препарата или элюента нарушается, а это может привести к существенному ухудшению разрешающей способности колонки.

Следовательно, особое внимание необходимо уделять тщательности соединения трубок. На рис. 32 в качестве примера показан момент присоединения трубки от резервуара к трубке адаптора.

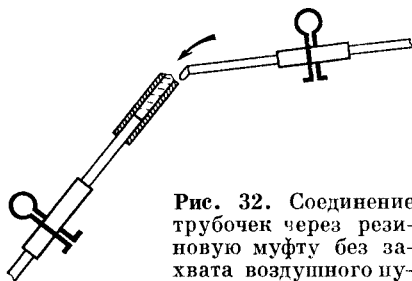


Рис. 32. Соединение трубочек через резиновую муфту без захвата воздушного пузыря (см. текст)

Расположенная внизу, она заканчивается соединительной резиной. Эта трубка должна быть до конца заполнена жидкостью, чтобы наружу выступал выпуклый мениск. Если жидкости в резинке недостаточно, то ее можно пополнить через иглу из шприца. Слив из колонки в это время, разумеется, должен быть перекрыт. Верхняя трубка от резервуара присоединена тоже через резинку, которую можно пережать зажимом в тот момент, когда из трубки капает

жидкость, так что капля повиснет на конце трубки. Теперь этот конец надо вставить в резинку адаптора. Капля сливается с мениском, лишняя жидкость при вдвигании трубки выдавливается, и воздух не может попасть внутрь. Эту операцию надо повторять каждый раз, когда приходится разъединять и снова соединять трубки, например при переходе от внесения препарата к элюции или при смене элюентов. Общее правило здесь таково: отток жидкости по трубкам от места соединения должен быть перекрыт. Приток возможен — при некотором навыке трубку, идущую от резервуара или насоса, можно вставить и в тот момент, когда из нее капает жидкость. Для удобства можно шприц с препаратом и трубку от резервуара присоединить к трехходовому крану (но так, чтобы в него не попал воздух), а выход из крана — к адаптору. Тогда переход от внесения препарата к началу элюции осуществится просто поворотом крана.

Для хроматографических систем, работающих при повышенном давлении (до 20 атм), разработаны и выпускаются разнообразные инжекторные краны. Имеются в продаже двух-, четырех- и шестипозиционные краны, как вращающиеся с петлей для препарата, подобно тому как описано ниже для инжекторов высокого давления, так и переключающиеся путем поступательного движения. Есть краны с ручным управлением, а есть и с пневматическим или дистанционным от электромотора (фирмы «Rheodyne», «Whatman» и др.). Для соединения между собой трубок, работающих под давлением в несколько атмосфер, вместо простых и удобных резинок прихо-

дится использовать специальные переходники, где конический раструб, выполненный на конце тефлоновой трубки, накидной гайкой прижимают к конусу переходника или же конец трубки уплотняется в переходнике резиновой прокладкой, которую тоже обжимает гайка.

## ПЕРИСТАЛЬТИЧЕСКИЕ НАСОСЫ

Для подачи элюента на хроматографическую колонку низкого давления (до 5 атм) используют перистальтические насосы. В них жидкость не контактирует ни с чем, кроме трубки из силиконового резины или «тайгона», внутри которой она находится. Насосы обеспечивают минимум пульсаций потока и возможность плавной регулировки скорости подачи — от сотых долей миллилитра до соте миллилитров в час. Перистальтические насосы выпускаются двух типов: роликовые и планетарные.

Схема роликового насоса показана на рис. 33. Резиновую трубку пережимают ролики, смонтированные по периферии вращающегося диска. Продвигаясь вдоль трубки, каждый из роликов поочередно продавливает через нее жидкость в направлении своего движения. Степень сжатия трубки можно регулировать с помощью винта, прижимающего профилированную направляющую пластину к которой прилегает трубка. Нередко конструкция насосов позволяет варьировать диаметр трубок, например в пределах от 1 до 3 мм, что дает возможность переходить от одного диапазона скоростей подачи элюента к другому. Внутри каждого диапазона плавная регулировка скорости подачи осуществляется изменением скорости вращения диска с роликом. Эту скорость удается изменять в очень широких пределах благодаря использованию «шаговых электромоторов», работа которых контролируется длительностью частотой электрических импульсов, вырабатываемых встроенным насосом электронным генератором импульсов (при очень малых скоростях подачи жидкости можно заметить, что насос работает толчками). Многие фирмы выпускают многоканальные насосы, где ролики пережимают одновременно несколько параллельно лежащих трубок одинакового диаметра, обеспечивая подачу жидкости с одинаковой скоростью по трем и более каналам.

На фотографии (рис. 34) показан трехканальный перистальтический насос фирмы «Pharmacia» (тип Р-3). Хорошо видны роликовый съемный блок с направляющими пластинами и винты для индивидуальной регулировки поджатия каждой пластины. Эта же фирма выпускает и надежный малогабаритный одноканальный насос (тип Р-1). Для удобства эксплуатации во многих насосах предусмотрен возможность с помощью тумблера мгновенно переключать направление подачи жидкости на обратное, а также возможность, не меняя регулировки рабочей скорости, на время пустить насос на максимальные обороты. Последняя модель роликового перистальтического насоса фирмы «LKB» с торговым названием «Micro Perrex» (диапазон скоростей 0,5—500 мл/ч) оснащена микропроцессором, ос-

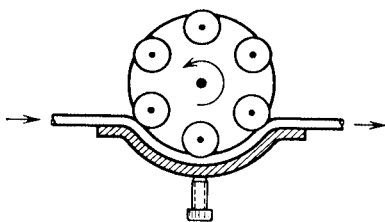
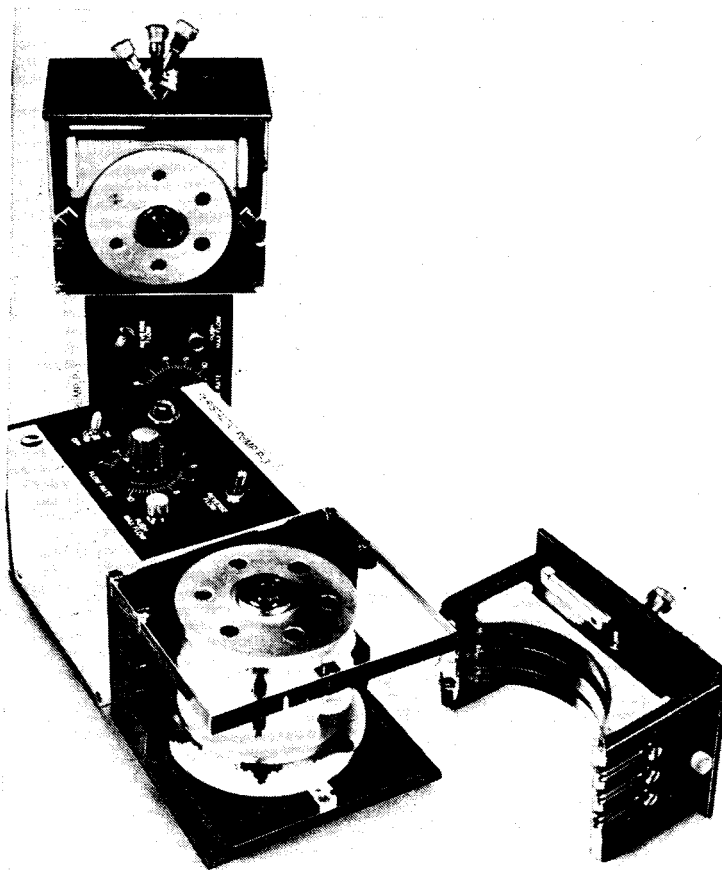


Рис. 33. Схема перистальтического насоса роликового типа

Рис. 34. Трехканальный перистальтический насос фирмы «Pharmacia»



пеществляющим (и запоминающим) калибровку скорости подачи жидкости, и цифровым индикатором скорости. Генератор импульсов этого насоса стабилизирован кварцем.

Современные перистальтические насосы (в том числе «Pharmacia» Р-1 и «Місго Регрех») могут управлять работой коллектора фракций, подавая ему команду на смену пробирок после прокачивания заранее заданного объема фракции. Такая возможность имеется и у



насоса «Minipuls» фирмы «Gilson», который оснащен сменными головками на 1, 2, 4 или 8 каналов и может создавать давление до 5 атм в интервале скоростей 0,06—6000 мл/ч. Перистальтические насосы роликового типа выпускают также фирмы «ISCO» (модель 1612, двухканальный) и «Desaga» («STA — Multipurpose peristaltic pump», шестиканальный).

Роликовые насосы любой конструкции имеют один общий недостаток — проскальзывая по резиновой трубке, ролики постепенно ее изнашивают. В связи с этим были разработаны конструкции перистальтических насосов планетарного типа (рис. 35). Как и в роликовом насосе, расположенные по периферии ролики здесь пережимают трубку, опирающуюся на направляющую пластину. Разница заключается в том, что ролики не проскальзывают, а катятся по трубке. Это достигается тем, что они приводятся во вращение (в обратную по отношению к их движению вдоль трубки сторону) от центрального ролика. Такую «планетарную» систему использовала до последнего времени в своих насосах фирма «LKB» (одноканальная модель «Vario Perplex» с диапазоном скоростей 0,2—400 мл/ч и четырехканальная модель «Multi Perplex» с диапазоном 5—5000 мл/ч в каждом канале). Планетарные насосы выпускает также фирма «Desaga» — «Micro PLG — peristaltic pump» (два канала; 0,1—50 мл/ч) и «PLG — multipurpose peristaltic pump» (шесть каналов; 0,5—4500 мл/ч).

Однако планетарная система, базирующаяся на трении, имеет свой недостаток — постепенно истираются трущиеся друг о друга ролики, так что центральный ролик начинает проскальзывать. Вероятно, по этой причине фирма «LKB» в своей последней модели «Micro Perplex» вернулась к системе роликового перистальтического насоса. В последней модели насоса «WIZ» фирмы «ISCO» планетарная система роликов, катящихся по трубке, приводится в движение с помощью зубчатой передачи. Этот четырехканальный насос можно использовать в качестве дозатора заданного объема жидкости («dispenser»), а также как устройство, осуществляющее разбавление препарата в заданное число раз («diluter»).

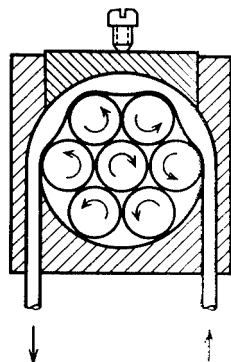


Рис. 35.  
Схема  
перистальтического  
насоса планетарного  
типа

## ДЕТЕКТОРЫ

Назначение детектора — вести непрерывную регистрацию какого-либо физического параметра в токе выходящего из колонки элюента для обнаружения и количественной оценки ширины и амплитуды пика вещества. На практике чаще всего пользуются возможностью регистрации одного из трех параметров: оптической

плотности раствора, флюоресценции или радиоактивности. Имеются детекторы, регистрирующие изменение коэффициента преломления жидкости или ее электропроводности, но для хроматографии белков и нуклеиновых кислот они широкого распространения не получили. Детекторы, регистрирующие радиоактивность препарата, выходящего в токе жидкости, были упомянуты в предыдущей книге при подробном рассмотрении методов регистрации радиоактивности. Их чувствительность невысока, так что используются они относительно редко. Детекторы флюоресценции обеспечивают очень высокую чувствительность обнаружения элюируемого вещества, поэтому в последние годы они используются все чаще. Однако при этом требуется дополнительная операция окраски вещества флюоресцентным красителем, поэтому наиболее широко используются детекторы, регистрирующие оптическую плотность элюента (поглощение света веществом).

Большинство аминокислот практически не поглощает свет в доступной для регистрации области, так что их приходится окрашивать нингидрином. Этот метод окраски будет подробно рассмотрен в приложении 2, посвященном аминокислотным анализаторам. Пептиды и белки поглощают свет в области 206—215 нм за счет пептидной связи и в широкой области спектра с максимумом вблизи 280 нм за счет присутствия в них ароматических аминокислот. Азотистые основания и нуклеиновые кислоты хорошо поглощают вблизи 260 нм. Поэтому не удивительно, что основной метод детектирования в хроматографии белков и нуклеиновых кислот — это регистрация поглощения света в ультрафиолетовой области спектра. Соответствующие приборы мы будем для краткости именовать УФ-детекторами.

### УФ-детекторы

Главным элементом детектора является источник ультрафиолетового света. В качестве такового широко используют ртутную лампу низкого давления. Более 90% испускаемого ею света приходится на долю яркой спектральной полосы с длиной волны 254 нм. Это особенно удобно для регистрации нуклеиновых кислот и их компонентов. Излучение с длиной волны вблизи 280 нм можно получить с помощью той же лампы, если ее светом облучать флюоресцирующий на этой длине волны «вторичный» источник света. Такая система использовалась, например, до недавнего времени фирмой «LKB» в детекторах типа «Uvicord I» и «Uvicord II». В новой модели УФ-детектора «Uvicord S» эта фирма устанавливает безэлектродную газоразрядную лампу, дающую сильную линию испускания света с длиной волны 206 нм и широкий максимум вблизи 280 нм. Для чувствительной регистрации поглощения вблизи 254 нм в этот прибор можно установить и обычную ртутную лампу низкого давления. Регистрация поглощения белковых растворов при 206 нм позволяет значительно повысить чувствительность детектора (например, для  $\gamma$ -глобулина — в 40 раз), поскольку при 206 нм

поглощает каждая пептидная связь, в то время как при 280 нм — только ароматические аминокислоты, число которых в составе белка может быть невелико.

В УФ-детекторах фирмы «Pharmacia» UV-1 и UV-2 установлена ртутная лампа низкого давления, в новой модели UV-1/214, предназначенной специально для регистрации белков и пептидов, ее заменяет цинковая лампа низкого давления, имеющая яркую полосу свечения при 214 нм. Использование дейтериевой лампы и монохроматоров в детекторах для обычной хроматографии практикуется редко ввиду дороговизны этих приборов и малой интенсивности света. Такие монохроматоры применяются для высокочувствительной ЖХВД.

Большое внимание в конструкции УФ-детекторов уделяется стабилизации интенсивности света лампы, поскольку от этого зависит стабильность нулевой линии регистратора. Используется термостатирование ламп и отрицательная обратная связь от интенсивности света к напряжению питания лампы.

Важную роль в устройстве детектора играет рациональная конструкция кювет, исключающая возможность образования областей застоя жидкости. Применяются как цилиндрические, так и прямоугольные кварцевые кюветы объемом в несколько десятков микролитров с длиной оптического пути от 2 до 10 мм. В конструкции УФ-детектора UV-2 применена система одновременного прохождения света по двум путям (рис. 36): вдоль длины прямоугольной кюветы (20 мм) и в поперечном направлении (1 мм). Если такой прибор укомплектовать двухканальным регистратором (например, «REC-482» фирмы «Pharmacia»), то можно при одном и том же усилении сигнала с фотоэлементов вести регистрацию одновременно на двух значениях чувствительности, отличающихся друг от друга в 20 раз. Это позволяет заметить пик малого поглощения и одновременно пропустить форму интенсивных пиков от сильно поглощающих компонентов смеси веществ. Многие фирмы строят свои УФ-детекторы по двухлучевой схеме: прибор оснащается дополнительной кюветой сравнения, через которую может протекать чистый элюент, а луч света от лампы с помощью полупрозрачного зеркала расщепляется и проходит параллельно через две кюветы — рабочую и кювету сравнения. Двухлучевая схема позволяет исключить из регистрации собственное поглощение элюента, которое может изменяться в ходе градиентной элюции, а также компенсирует изменения яркости лампы, упрощая решение проблемы ее стабилизации.

В качестве приемников энергии в детекторах используются высокочувствительные фотоэлементы. Напряжение с нагрузки фотоэлемента усиливается логарифмическим усилителем, на выходе которого образуется «сигнал» напряжения, пропорциональный оптической плотности детектируемого раствора, с амплитудой порядка 10 мВ. Этот сигнал и управляет положением пера потенциометрического регистратора. В зависимости от интенсивности поглощения света веществом с помощью переключателя диапазонов чувстви-

тельности можно задавать разные степени усиления усилителя, так чтобы отклонение пера от нулевой линии на всю ширину ленты регистратора (20—25 см) соответствовало максимальному значению оптической плотности раствора. Как хорошо видно на фотографии (рис. 37), каждый из двух усилителей УФ-детектора UV-2 имеет 8 диапазонов усиления в пределах от 0,1 до 20 оптических единиц для «поперечного луча» с длиной оптического пути в 1 мм и в пределах от 0,005 до 1 оптической единицы для луча, идущего вдоль кюветы. УФ-детекторы UV-1 и UV-2/214 фирмы «Pharmacia» также собраны по двухлучевой схеме со сменными кюветами с длиной оптического пути (только в одном направлении) 3 и 10 мм. Они укомплектовываются одноканальным регистратором REC-481.

Конструкторы фирмы «LKB» в модели «Uvicord III» использовали двухлучевую схему и автоматическое переключение диапазонов чувствительности для регистрации пиков большой амплитуды. Однако в уже упоминавшейся последней модели «Uvicord S» они вернулись к однолучевой схеме с 9 диапазонами чувствительности (от 0,005 до 2 единиц оптической плотности раствора на всю шкалу) и без автоматического переключения. По-видимому, это сделано в интересах удешевления прибора и повышения его надежности. Модель «Uvicord S II» можно укомплектовать сменными фильтрами для работы в длинноволновых участках спектра вблизи 313, 365 и 405 нм, т. е. для регистрации поглощения некоторых витаминов, антибиотиков, НАД-Н, гемоглобина и цитохромов. Фирма «LKB» предлагает свой потенциометрический регистратор (модель 2210), хотя надо заметить, что современные УФ-детекторы любой фирмы могут работать в сочетании с почти любым лабораторным регистратором потенциометрического типа. В каталоге изделий фирмы «LKB» сохраняет свое место и давно апробированный печатающий шестиканальный регистратор магнитоэлектрического типа с вертикальной лентой (модель 2065). Этот регистратор нельзя использовать с УФ-детекторами других фирм без специальных «согласующих» электронных цепей, так как его входное сопротивление очень мало по сравнению с сопротивлением любого потенциометрического регистратора.

Успешно конкурирующая с названными выше фирма «Gilson» выпускает двухлучевой УФ-детектор (модель 111-B), оснащенный ртутной лампой низкого давления, одна половина которой покрыта составом, фосфоресцирующим на длине волны 280 нм. Сменные кюветы на 1,3; 11 и 40 мкл с длиной оптического пути 5 и 10 мм рассчитаны на давления жидкости до 70 атм. Прибор имеет 8 диапазонов чувствительности в интервале от 0,005 до 1 оптической единицы на всю шкалу. Эта же фирма выпускает спектрофотометр с монохроматором на дейтериевой лампе с интервалом длин волн от 190 до 600 нм и 8 диапазонами чувствительности от 0,01 до 2 оптических единиц на шкалу («HM Holochrome») (рис. 38).

Фирма «Bio-Rad» выпускает простой двухлучевой УФ-детектор на длины волн 254 и 280 нм («UV Monitor», модель 1300). Аналогичные приборы поставляют фирмы «Pierce» («Chromato Flo») и «ISCO»

A diagram of a beam supported at both ends by blocks. A vertical arrow points downwards from the center of the beam, representing a point load. The beam is shown in a perspective view.

The figure consists of two side-by-side photographs of the Dual Path Monitor UV-2. The left photograph shows the Optical Unit, which is a dark rectangular box with a control panel on the right. The panel has labels for 'SAMPLE' and 'REFERENCE' at the top, and 'OUT' and 'IN' on the right. There are four circular ports or detectors arranged in a 2x2 grid. The right photograph shows the Control Unit, which is a similar dark rectangular box with a control panel on the right. The panel has two main sections for wavelength selection: '1mm' and '20mm'. Each section has a dial with numerical values (0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 100, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 100) and a 'Zero' button. Below these are two dials labeled 'OD' and 'TRANS', and a 'BASE LINE' dial. The rightmost part of the control panel has a 'ON' button.



(модель 226). Последняя фирма предлагает еще один многоцелевой прибор (модель UA-5), где с блоком управления, в который встроены и потенциометрический регистратор, может быть связан как блок регистрации УФ-поглощения (тип 6: 254, 280 нм), так и блок флуориметра (тип 7: возбуждение флуоресценции в диапазоне 310—

390 нм, регистрация в диапазоне 430—650 нм). В новом оптическом блоке Т9 (поставка с 1982 г.) имеется возможность с помощью сменных кассет использовать, кроме ртутной, еще цинковую и кадмиевую лампы, обеспечивающие регистрацию поглощения при 214 и 229 нм. С помощью этих ламп и набора фильтров можно вырезать узкие полосы спектра еще для 12 длин волн в интервале 308—643 нм. Имеется также и портативный спектрофотометр («ISCO», модель V4) на диапазон длин волн 190—750 нм, с 10 диапазонами чувствительности в интервале 0,002—2 оптические единицы на шкалу. Аналогичный прибор производит и фирма «LKB» (модель 2151).

### Флюориметры

Наибольшей популярностью пользуется малогабаритный флюориметр фирмы «Gilson» (модель 121) (рис. 39). Это более чувствительный, чем UA-5, прибор, оснащенный фотоумножителем. Источником света служит лампа с широким спектром излучения (320—800 нм). С целью избирательной регистрации флюоресценции о-фталевого альдегида имеются специальные фильтры для возбуждающего света и флюоресценции (360 и 455 нм); регистрацию флюоресцирующего вещества обеспечивает другая пара фильтров (390 и 475 нм). Кроме них, есть еще 12 пар фильтров. Имеются сменные кюветы на 9 и 0,6 мл; последняя — для работы в микромасштабе с очень тонкими колонками для ЖХВД. Надежность, чувствительность и быстродействие обеспечили флюориметру фирмы «Gilson» широкую известность — некоторые другие фирмы комплектуют им свои жидкостные хроматографы высокого давления.

### КОЛЛЕКТОРЫ ФРАКЦИЙ

Для разделения всего объема элюата на фракции с целью отбора тех из них, которые содержат нужные компоненты исходной смеси веществ, широко применяют автоматические коллекторы фракций. Объем фракций задается экспериментатором или избирается самим прибором в соответствии с объемом выходящих из колонки пиков. Фракции собираются прибором в пробирки, стаканы, флаконы, скитилляционный счетчик или колбы. Объем каждой фракции может варьировать от долей миллилитра до десятков миллилитров, их число доходит до 300, а продолжительность сбора одной фракции может составлять минуты или часы — все это ставит перед конструкторами коллекторов непростые задачи по сочетанию вариabельности рабочих параметров с компактностью и надежностью работы прибора. Последнее требование имеет особо важное значение, поскольку коллекторы работают, как правило, без наблюдения за ними (например, в ночное время), а также нередко в условиях повышенной влажности, в холодной комнате.

На рис. 40 представлены схемы наиболее распространенных вариантов прямоугольной конструкции коллектора. В первом ва-

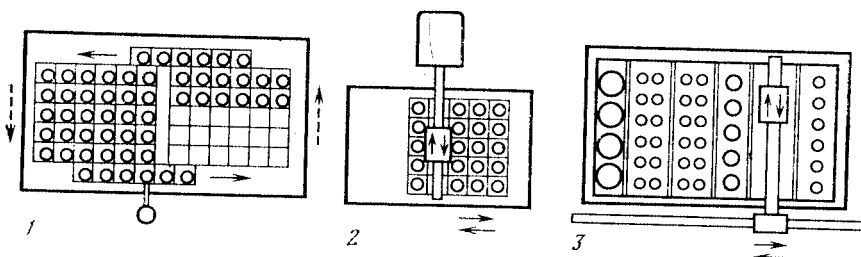
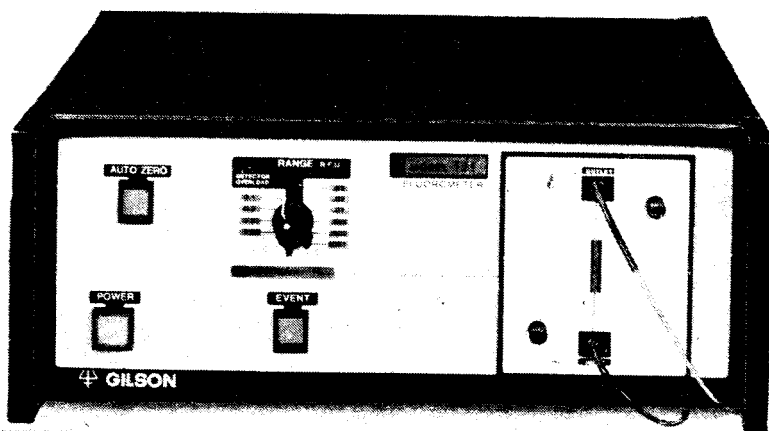


Рис. 39. Проточный флюориметр фирмы «Gilson» (модель 121)

Рис. 40. Три варианта конструкции прямоугольных коллекторов фракций

рианте капельница, которой заканчивается трубочка, идущая от колонки, остается неподвижной. Штативы с пробирками или флаконами установлены в две группы. В то время как передний штатив левой группы проходит мимо капельницы, задний штатив правой группы переходит в левую группу. По окончании сбора фракций в пробирки одного штатива обе группы целиком перемещаются в противоположных направлениях, так что первая пробирка следующего штатива левой группы оказывается под капельницей, а задний штатив правой группы выходит на исходную позицию для своего перемещения влево. Во втором варианте (малогабаритный коллектор) капельница совершает возвратно-поступательное движение вдоль траверсы, а весь блок пробирок продвигается мимо нее, подводя под капельницу следующий ряд пробирок после того, как заканчивается заполнение предыдущего ряда. В третьем варианте все пробирки или иные сосуды установлены в неподвижные (но легко съёмные) штативы, капельница движется вдоль траверсы,

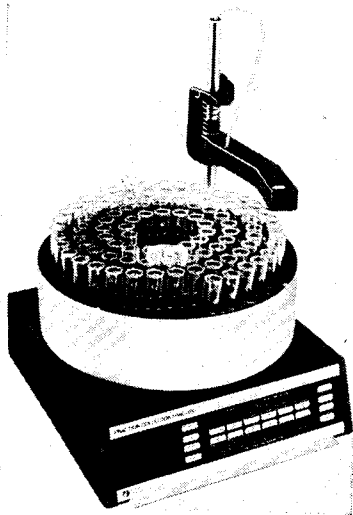


Рис. 41. Коллектор фракций «FRAC-100» фирмы «Pharmacia»

а траверса по окончании заполнения сосудов одного штатива передвигается к следующему. Этот вариант конструкции отличается наибольшей гибкостью и экономичностью размещения, так как позволяет установить в коллектор сосуды различной емкости в соответствии с ожидаемым соотношением объемов полезных фракций и «пустых» участков элюента между ними. Движениями капельницы и траверсы управляет микропроцессор по заранее заданной программе, выполнение которой корректируется самими пиками выходящего из колонки вещества с помощью сигналов от УФ-детектора.

Как всегда, расширение функций и автоматизации операций, которые иной раз может без особого труда выполнить человек, ведет к усложнению прибора, заметному росту его стоимости, а иногда —

и снижению надежности работы. Целесообразность использования далеко идущей автоматизации (и соответствующих затрат) следует оценивать, исходя из характера и частоты постановки хроматографических экспериментов. Эта оценка далеко не всегда может оказаться в пользу коллектора с программным управлением. Вот почему многие фирмы наряду с такими коллекторами выпускают и относительно простые, надежные и дешевые модели. Любопытно отметить здесь, что вновь появились в продаже круговые коллекторы, в которых пробирки располагаются по концентрическим окружностям или по спирали, а их смена обеспечивается поворотом барабана, в который они установлены. Радиальное перемещение капельницы с окружности на окружность или постепенно вдоль спирали осуществляется за счет поворота рычага, на котором она установлена (рис. 41). Конструктивно осуществление поворотов вокруг оси всегда проще, а нередко и надежнее, чем обеспечение возвратно-поступательных движений.

Дозировка объема фракций может осуществляться различными способами. Почти вышла из употребления дозировка по суммарному объему фракции с помощью сифона (как, например, в простом коллекторе фирмы «ISCO», модель 2111). Стекланные сифоны хрупки и пригодны лишь для сбора относительно больших объемов. Широко распространенная дозировка путем отсчета капель с помощью фотоэлемента не отличается точностью (иногда отклонения достигают  $\pm 20\%$ ), поскольку поверхностное натяжение жидкости и объем капли могут изменяться как в ходе элюции за счет смены



элюента, так и от опыта к опыту за счет колебаний температуры и давления окружающего воздуха. Дозировка путем отсчета времени с помощью установленного в коллекторе таймера опирается на постоянство скорости подачи элюента насосом. Между тем, эта скорость может изменяться в ходе хроматографического опыта за счет изменения сопротивления колонки. Наиболее совершенным является вариант импульсного управления коллектором (сменой фракций) от перистальтического насоса, исходя из фактической скорости его работы. Эту функцию могут выполнять насосы Р-1 (фирма «Pharmacia»), «Micro Perplex» («LKB»), «Minipuls Volumetric» («Gilson») и модель 1612 («ISCO»).

Некоторый минимальный уровень автоматизации, разумеется, предусмотрен даже в самой простой модели коллектора, например задание объема фракций и их числа до автоматической остановки коллектора и насоса или подача отметки на ленту регистратора после каждой смены пробирки (желательно с учетом сдвига по объему между моментом прохождения фракции через кювету детектора и ее поступлением в пробирку). Удобно, если коллектор снабжен цифровым индикатором номера фракции и объема, уже поступившего в пробирку. Во многих случаях, особенно при работе с радиоактивно меченными веществами, необходимо, чтобы в коллекторе было предусмотрено устройство, управляющее клапаном, который запирает колонку во время смены пробирок. Нелишним является оснащение прибора «памятью» на случай временного отключения напряжения в сети, с тем чтобы он мог возобновить свою работу с прерванного положения после включения тока. Все электронные управляющие устройства желательно герметизировать для обеспечения стабильной работы во влажной атмосфере.

Менее необходимо (но в случае большой загрузки оправдано) использование коллекторов с микропроцессорами и программным управлением. Такие коллекторы, например, могут отбирать только материал, выходящий в составе пиков, и сливать элюент между ними, собирать четкий одиночный пик в одну пробирку, а плохо разделившиеся пики — в несколько пробирок малого объема. Управление этими операциями происходит в зависимости от амплитуды поглощения света, которую по заданной программе оценивает специальное устройство, именуемое «Level-sensor» («Pharmacia», «LKB») или «Peak detector» («Gilson»).

С помощью системы управляемых кранов связанный с коллектором дополнительный контрольный блок (например, «FRAC-CC Chromatography controller» фирмы «Pharmacia») может осуществлять в заданном режиме промывку и уравнивание колонки, внесение препарата, смену буферов и градиентов элюции и др.

Ниже приведены краткий перечень и основные параметры наиболее употребительных коллекторов фракций.

**Фирма «Pharmacia».** 1. Прямоугольный коллектор (вариант 3) с программным управлением «FRAC-300» на 300 пробирок диаметром 8—12 мм, или 200 пробирок диаметром 12—18 мм, или 50 стаканчиков (флаконов) диаметром 18—38 мм, или любую их комбинацию, набираемую в 10 штативах. Отбор фрак-

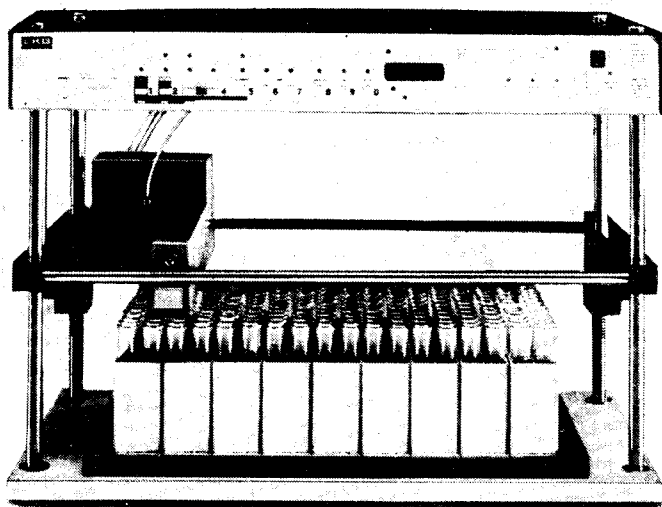


Рис. 42. Коллектор фракций «2211-SuperRac» фирмы «LKB»

ций — по времени (0,1—100 мин), по числу капель (1—1000) или под контролем перистальтического насоса P-1. Размеры  $60 \times 40 \times 31$  см, вес 13 кг. Комплектация: «Level sensor FRAC-LS» и «Chromatography controller FRAC-CC».

2. Малогабаритный коллектор спирального типа «FRAC-100» на 100 пробирок, с упрощенной системой программного управления.

Фирма «LKB». 1. Прямоугольный коллектор (вариант 3) с программным управлением «2211 Super Rac» на 312 или 180 пробирок, или 84 сцинтилляционных флакона диаметром 28 мм. Отбор фракций — по времени (0,1—99,9 мин), по числу капель (1—999) или под контролем перистальтического насоса 2132 «Micro Perrex». Размеры  $55 \times 33 \times 43$  см, вес 18,5 кг (рис. 42).

2. Прямоугольный коллектор (вариант 1) на 200 пробирок (в 20 штативах) «2070 Ultro Rac». Отбор фракций — как у «Super Rac». Необходимый минимум автоматизации. Надежность прибора апробирована многолетним опытом. Размеры  $52 \times 33 \times 25$  см, вес 20 кг.

3. Простой неавтоматический коллектор спирального типа «2112 Redi Rac» на 100 пробирок диаметром 16 мм или 45 флаконов по 28 мм. Отбор фракций — как и в двух предыдущих моделях. Размеры  $38 \times 27 \times 27$  см, вес 3,3 кг.

Фирма «ISCO». 1. Прямоугольный коллектор (вариант 3) «FOXY» с микропроцессором и разнообразными возможностями программирования и анализа пиков с помощью блока «LC Peak Separator». Съемные штативы на 144 пробирки, 72 сцинтилляционных флакона или 36 воронок для слива элюата любого объема в отдельно стоящие емкости. Отбор фракций — по времени, по числу капель или по объему (при дополнительной установке сифона, модель 405). Размеры  $59 \times 22 \times 31$  см, вес 42,3 кг.

2. Прямоугольный коллектор (вариант 1) «Retriever III», аналогичный коллектору «Ultro Rac», но с более широким набором штативов, в том числе для сцинтилляционных флаконов.

3. Модель 1850 — упрощенный вариант такого же прямоугольного коллектора (без автоматизации), вмещающий до 210 пробирок.

4. Модель 1220 — миниатюрный коллектор того же типа на 114 пробирок, вес 8 кг.

5. Модель 2111 — простой коллектор кругового типа на 100 пробирок или 40 сцинтилляционных флаконов, вес 9,8 кг.

Фирма «Gilson». 1. Мпипаторный прямоугольный коллектор (вариант 2) на 80 пробирок «Microsol TDC 80». Отбор фракций — по времени, по числу капель или под контролем перистальтического насоса той же фирмы «Minipuls Volumetric». Необходимый минимум автоматизации. Прибор привлекателен своей компактностью ( $35 \times 15 \times 29$  см) и простотой.

2. Два прямоугольных коллектора с неподвижными пробирками в легко-съемных штативах, отличающиеся друг от друга по емкости и габаритам. Модель 201 в одном из нескольких вариантов штативов позволяет установить 80 пробирок размером  $1,3 \times 10$  см, а модель 202—300 таких пробирок. Оба коллектора комплектуются штативами с воронками для сбора фракций неограниченного объема, а также штативами для микропробирок, сцинтилляционных флаконов и др. Гибкую программу отбора нужных фракций или пиков можно задать с помощью автономного малогабаритного программного устройства.

## ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Хроматографию белков нередко необходимо вести на холоду. Использовать для этой цели холодную комнату не всегда удобно. В связи с этим уместно упомянуть специальные холодильные шкафы с прозрачными дверцами, предназначенные для установки в них всего комплекса хроматографического оборудования (кроме регистратора, который удобнее установить снаружи).

Фирма «LKB» выпускает две модели таких шкафов: «Combi Cold Rac» емкостью 830 л и «Mini Cold Lab» емкостью 525 л (площадь основания  $77 \times 77$  см). Эти шкафы могут поддерживать внутри заданную температуру в пределах  $0-20^\circ$  с точностью  $\pm 1,5^\circ$ .

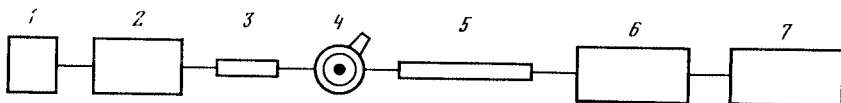
Фирма «ISCO» выпускает аналогичный холодильный шкаф меньшего объема (250 л) — модель 339. Он пригоден для установки любого из коллекторов этой фирмы, а также коллектора «Ultro Rac» фирмы «LKB».

В некоторых случаях для проведения хроматографического процесса нужно не охлаждение, а термостатирование колонки при определенной положительной температуре. Для этой цели можно воспользоваться любым лабораторным термостатом с насосом или специальным термостатом фирмы «LKB» «2209 Multi Temp», который способен поддерживать температуру термостатирующей жидкости от  $-10^\circ$  (метанол) до  $+100^\circ$  с точностью  $\pm 0,4^\circ$  и подавать ее в рубашку колонки со скоростью 18 л/мин.

## ХРОМАТОГРАФИЯ ПРИ ВЫСОКОМ ДАВЛЕНИИ

Уже упоминалось, что высокоэффективная жидкостная хроматография при высоком давлении (ЖХВД) получила очень широкое распространение главным образом в качестве экспресс-метода технологического контроля производства низкомолекулярных природных (и неприродных) соединений. В исследованиях белков и нуклеиновых кислот ЖХВД играет пока более скромную, но заметную роль (фракционирование пептидов, идентификация аминокислот при секвенировании белков и др.). Далее мы увидим, что для исследо-

вания биологических макромолекул, по-видимому, наибольший интерес представляет развитие жидкостной хроматографии при умеренных давлениях (до 30 атм). Тем не менее, в последующих главах мы постараемся осветить относящиеся к нашей теме достижения ЖХВД, а здесь бегло познакомимся с соответствующей хроматографической техникой. Она отличается своеобразием, вытекающим из двух главных особенностей ЖХВД: хроматографическая элюция идет под давлением, достигающим 400 атм и более, а весь хроматографический процесс укладывается в интервал времени 10—30 мин.



**Рис. 43.** Блок-схема элементов системы хроматографии при высоком давлении (ЖХВД)

1 — резервуар с элюентом; 2 — насос; 3 — предколонка; 4 — инжектор; 5 — колонка; 6 — детектор; 7 — регистратор

То и другое связано с использованием гранул со средними размерами 10, 5 и даже 3 мкм, что позволяет получить очень хорошее разделение при большой скорости элюции (см. гл. 1), а высокое давление необходимо для того, чтобы обеспечить такую скорость в условиях повышенного сопротивления мелких, плотно упакованных гранул.

На рис. 43, где представлена простейшая блок-схема элементов системы ЖХВД, в одном ряду с новыми элементами (предколонка, инжектор) стоят и уже знакомые хроматографические приборы, к которым, однако, предъявляются совсем иные требования, и поэтому здесь можно ожидать появления новых конструктивных решений. Особенно это относится к насосу, который должен не только создавать давление в несколько сот атмосфер, но и работать без пульсаций, недопустимых ввиду малой длительности выхода отдельных хроматографических пиков (иной раз — несколько секунд). Помимо высокой чувствительности, детектор и регистратор должны отличаться быстрейшим, достаточным для того, чтобы регистрировать форму таких пиков без искажений. Кювета детектора находится уже при низком давлении, за колонкой, но в случае засорения давление в ней может увеличиться. Колонки и трубопроводы выполняются из нержавеющей стали, их соединения и уплотнения должны быть рассчитаны на высокое давление. Система не имеет запорных кранов, так как при остановке насоса из-за колоссального гидравлического сопротивления колонки течение жидкости прекращается. Особые меры предосторожности принимают для защиты дорогостоящей колонки от засорения микро частицами: перед колонкой устанавливают стальной фильтр с порами диаметром 2 мкм и короткую сменную предколонку, второе назначение которой состоит в том, чтобы уменьшить растворение силикагеля в основной колонке (раствор элюента насыщается сили-

кагелем в предколонке, и это сдвигает равновесие растворения в рабочей колонке). Наконец, инжектор обеспечивает возможность внесения препарата в колонку «на ходу» — без снижения давления. Рассмотрим теперь конструктивные особенности элементов системы и приведем некоторые справочные данные.

## КОЛОНКИ

На рис. 44 изображена колонка для ЖХВД, а также крупным планом и в разрезе показано уплотнение ее конца и подходящего к нему трубопровода. Аналогичная система монтируется и на втором конце колонки. Из рисунка видно, что уплотнение конца колонки и трубопровода осуществляется путем сжатия мощными стальными гайками конических прокладок из тефлона, иногда со специальным керамическим наполнителем. Аналогично осуществляется уплотнение соединений трубопроводов между собой, разного рода тройников и др. Разнообразные стандартные конструкции таких соединений производит фирма «Swagelok Fittings».

Рабочие размеры колонок для ЖХВД более или менее стандартизированы. Чаще всего используют колонки длиной 15, 25 и 30 см, хотя выпускаются и более длинные колонки — до 1,5 м. Набор внутренних диаметров тоже невелик: 2,1; 3,9; 4,6; 6,2; 7,8 и 9,4 мм; особенно «популярны» диаметры 3,9 и 4,6 мм. Правда, встречаются и диаметры 1,5; 2; 2,5; 4; 4,5; 6,5 и 10 мм. Колонки диаметром 7,8 мм и более в ЖХВД рассматриваются как препа-ративные. Предколонки тех же диаметров имеют длину 4—7 см.

Все чаще возникающая в последнее время необходимость фракционирования микроколичеств исходных препаратов, а также развитие высокочувствительных методов детектирования, с одной стороны, и стремление к экономии дорогостоящих элюентов для ЖХВД, с другой, привели к тому, что ведущие фирмы стали выпускать системы для хроматографии в микромасштабе. Такова, например, « $\mu$ LC System» фирмы «Beckman». В ее состав входит колонка типа «Ultrasphere ODS» диаметром 2 мм и длиной 25 см. Для работы с ней стандартное оборудование этой фирмы комплектуется дополнительными деталями: микрокюветой на 5 мкл для УФ-детектора (модель 160) и петлей препарата такого же объема. Фирма «LKB» в своей новой «Microbore HPLC System» предлагает две колонки «Ultrapac» RP8 и RP18 диаметром 1 мм при длине 25 см. Скорости элюции для таких колонок снижаются до 10—150 мкл/мин при сохранении обычного для ЖХВД времени разделения (5—20 мин). С этим связано 10—20-кратное снижение расхода элюента. Стандартный насос «LKB 2150 HPLC Pump» обеспечивает работу на указанных скоростях. УФ-детектор с переменной длиной волны (типа «LKB 2151») комплектуется микрокюветой объемом 0,8 мкл с длиной оптического пути 3 мм; инжектору придаются петли препарата на объемы 0,5, 1,2 и 5 мкл.

Пустые колонки поставляют фирмы «Bio-Rad», «Pierce», «Rainin» и др. Набивку колонок микрогранулярным сорбентом для ЖХВД

производят обычно из разбавленной суспензии под большим давлением с помощью специальных устройств. В лабораторных условиях выполнить эту операцию на уровне фирменных стандартов достаточно трудно, и подавляющее большинство исследователей предпочитает использовать готовые колонки, тем более что нормальный срок службы одной колонки составляет около года.

Разнообразие имеющихся в продаже типов готовых колонок для ЖХВД соответствует отмеченному выше разнообразию модифици-

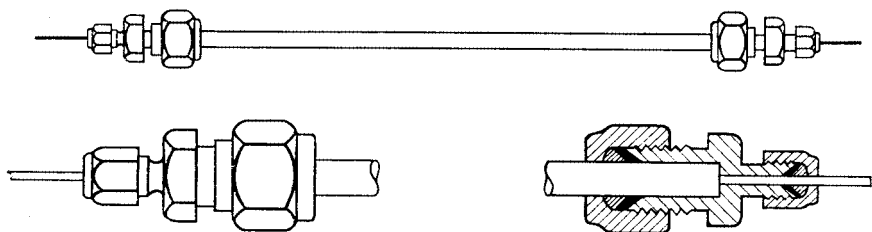


Рис. 44. Колонка для ЖХВД

рованных сорбентов на основе силикагеля, выпускаемых разными фирмами. Основную продукцию этих фирм составляют именно готовые колонки, а не сами сорбенты. Здесь нет смысла перечислять наименования и параметры колонок для ЖХВД — читатель их найдет в каталогах фирм, названных в гл. 2. Как правило, колонки именуются по заполняющему их сорбенту. Из крупных фирм только «Merck» перед названием сорбента вводит еще и общее наименование «Hibar», что означает колонку высокого давления (в отличие от колонок низкого давления «Lobar»).

Отметим также некоторые относительно новые идеи в конструировании колонок и соответствующие необычные наименования.

Фирма «Brownlee Labs» пропагандирует выпускаемые ею под названием «MPLC Catridges» укороченные колонки (4,6 мм × 10 см) и предколонки того же диаметра длиной 3 см, набитые тем же самым сорбентом (различно модифицированные — «Spheri 5» и «Lichrosorb»). Эти колонки и предколонки можно вручную свинчивать в специальных патронах, собирая тем самым колонки большей длины. По данным фирмы, на колонке длиной 10 см, уменьшив вдвое скорость элюции, при вдвое меньшем давлении можно получить столь же хорошее разрешение, как и на обычной колонке длиной 25 см.

Фирма «Waters» под названием «Radial-PAK Catridges» предлагает колонки для ЖХВД диаметром 5 или 8 мм и длиной 10 см, изготовленные из... полиэтилена. Перед использованием такую колонку зажимают в стальной патрон с защелками кулачкового типа («Z-Module» или RCM-100). Колонки заполнены одним из сорбентов той же или другой фирмы, например «Partisil SAX» или «SCX» (см. табл. 2).

## ВНЕСЕНИЕ ПРЕПАРАТА

Хорошо очищенный раствор препарата на аналитическую колонку для ЖХВД вносят обычно в количестве нескольких микролитров или десятков микролитров, не снижая высокого давления жидкости. Прежде чем описать устройство упомянутого выше инжектора, остановимся на другом варианте внесения раствора препарата — с помощью шприца Гамильтона путем прокалывания специальной прокладки («septum»). На рис. 45 изображен наконечник колонки, предназначенный для этой операции. Элюент от насоса подается через боковой отросток, а сверху через две прокладки, зажатые стальными шайбами с направляющими отверстиями посередине, вводится игла шприца. Благодаря малому диаметру поршня шприца Гамильтона нажатием пальца можно обеспечить необходимое давление в сотни атмосфер. После удаления иглы отверстие в прокладке герметически закрывается. Для этого прокладки изготавливают из силиконовой или неопреновой резины, усиленной нейлоном, и покрывают с обеих сторон тефлоном.

Конструкция шприца Гамильтона показана на рис. 46. Поршнем служит стальная проволока с тефлоновым наконечником, перемещающаяся в калиброванной толстостенной стеклянной трубке. На конце трубки прочно фиксирована игла длиной 5 см (наружный диаметр — 0,7 мм, внутренний — 0,12 мм). Выпускаются шприцы, рассчитанные на различные фиксированные микрообъемы. Широко используются шприцы марок LC-210 и -800 (фирма «Precision Sampling Co»).

Схема наиболее распространенного варианта инжектора представлена на рис. 47. Наружное кольцо статора имеет шесть равномерно расположенных по его окружности отверстий, к которым через соответствующие переходники постоянно подключены трубопроводы, идущие от насоса и к колонке (выводы 2 и 3), и калиброванная по объему сменная стальная «петля», которую заполняет препарат (выводы 1 и 4). В центральном вращающемся барабане имеются три канала. Заполнение петли производится в положении А из шприца через вывод 6 при атмосферном давлении. Излишек препарата через вывод 5 сливается. В этом же положении перед внесением препарата производится промывка петли буфером. В это время элюент от насоса под высоким давлением поступает на колонку. Затем барабан поворачивают вручную на строго фиксированный угол 60° (положение В). Теперь петля с препаратом оказывается включенной в тракт высокого давления — элюент от насоса выдавливает раствор препарата и направляет его в колонку. В петлю, предварительно заполненную элюентом, можно вносить препарат и в меньшем, чем объем петли, количестве. Гнездо для иглы шприца размещается в корпусе выведенной на панель прибора рукоятки поворота барабана инжектора. Такая конструкция используется в инжекторе «Rheodyne 7010» с петлей на 20 мкл, которым оснащено большинство современных хроматографов высокого давления. Фирма «Rheodyne» сейчас поставляет и микроинжекторы

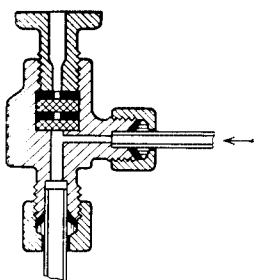


Рис. 45

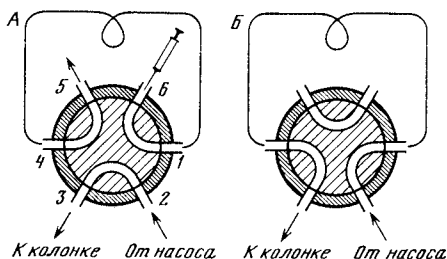


Рис. 47

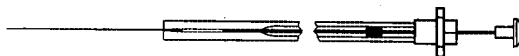


Рис. 46

Рис. 45. Наконечник колонки высокого давления, предназначенный для введения препарата путем непосредственного впрыскивания его в ток элюента с помощью шприца Гамильтона

Рис. 46. Шприц Гамильтона

Рис. 47. Схема инжектора препарата

А — положение ротора при заполнении петли раствором препарата; Б — положение ротора при внесении препарата на колонку

(модели 7410 и 7413), оснащенные взаимозаменяемыми петлями препарата объемом 0,5, 1,2 и 5 мкл. В модели 7413 можно установить сразу три петли и сменять их простым поворотом диска, несущего эти петли. Имеется и вариант инжектора с четырьмя выводами и поворотом барабана на 90° («Beckman-Altex», модель 210), работающего на том же принципе.

В конструкции своего инжектора типа «UGK» фирма «Waters» отказалась от поворотного барабана (из-за возможности его подтекания после некоторого износа) и ввела вместо этого два отдельных (сдвоенных) крана. Манипулируя последними, можно сначала заполнить при атмосферном давлении петлю препарата, а затем подключить ее к току элюента параллельно с относительно высоким гидравлическим сопротивлением. При этом 99% элюента проходит через петлю и уносит препарат в колонку. По окончании операции петлю можно перекрыть, и тогда весь ток элюента снова пойдет через гидравлическое сопротивление.

## НАСОСЫ

Как уже упоминалось, насосы — наиболее ответственная часть хроматографа, поэтому не удивительно, что имеется несколько вариантов не только конструкции, но и принципа работы этих приборов и они неустанно совершенствуются в ходе конкуренции разрабатывающих их фирм. Заметим, впрочем, что с позиций пер-



спектив хроматографии биополимеров на эту «гонку изобретательности» можно смотреть довольно равнодушно, ибо, как уже подчеркивалось, эти перспективы предъявляют куда более скромные требования как к уровню необходимого давления, так и к допустимой степени его пульсации. Тем не менее, познакомиться с основными развиваемыми здесь идеями, по-видимому, имеет смысл.

Несмотря на отмеченное разнообразие конструкций, большинство из них присущи некоторые общие черты. Необходимость обеспечения высокого давления заставляет использовать главным образом насосы плунжерного типа (правда, есть и мембранные). Возвратно-поступательное движение плунжеру задает вращение эксцентричного «кулачка». Чередование циклов всасывания и нагнетания жидкости обеспечивается работой шариковых клапанов. Плунжеры и клапаны изготавливают из сапфира или рубина. Схема насоса такого типа (рис. 48) не требует пояснений. По этой простой схеме работает очень популярный и надежный насос «Milton Roy Minipump». Три модели этого насоса (396-31, 396-57 и 396-89) предназначены для обеспечения расходов жидкости в диапазонах 16—160, 29—290 и 46—460 мл/ч соответственно. Регулирование подачи в указанных диапазонах можно производить в процессе работы насоса с помощью микрометрического винта. Такой насос может развивать давление до 500 атм. Ясно, что на его выходе неизбежны значительные пульсации давления.

Для снижения уровня пульсаций фирма «Du-Pont» в своих хроматографах устанавливает параллельно три насоса плунжерного типа, работающих со сдвигом по фазе на  $120^\circ$  друг относительно друга. Уровень расхода жидкости (0,1—10 мл/мин) регулируется изменением скорости вращения электромотора, которую определяет частота следования импульсов от электронного задатчика скорости.

Фирма «Beckman» («Altex») идет по пути ускорения движения плунжера на фазах всасывания и предварительного сжатия, что достигается заданием определенной частоты следования импульсов, управляющих электромотором. Имеется возможность независимой регулировки скорости всасывания (из-за опасности кавитации) и скорости предварительного сжатия (в зависимости от степени сжимаемости органического растворителя). Аналогичный принцип подавления пульсаций используют фирмы «Varian» и «Gilson».

В популярном насосе фирмы «Waters» (модель 6000 A) используется демпфирующая система с двумя цилиндрами. В то время как плунжер основного цилиндра подает жидкость на колонку, часть ее запасается во вспомогательном цилиндре. Эта часть жидкости продолжает питать колонку в течение времени, необходимого для всасывания новой порции жидкости в основной цилиндр. По тому же принципу работает насос в хроматографе фирмы «Spectra Physics».

Новая модель насоса (590) фирмы «Waters» в соответствии с запросами времени снабжена программным устройством с широкими возможностями автоматизации и запоминания режимов работы; кро-

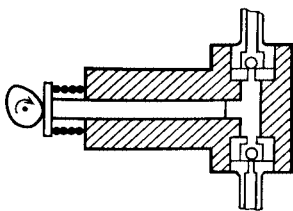


Рис. 48. Схема простейшего насоса плунжерного типа

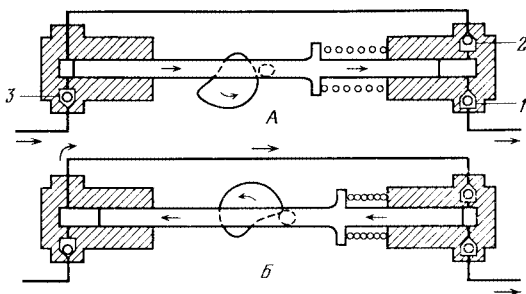


Рис. 49. Принцип работы насоса ВТ3020 фирмы «Biotronik» (см. текст)

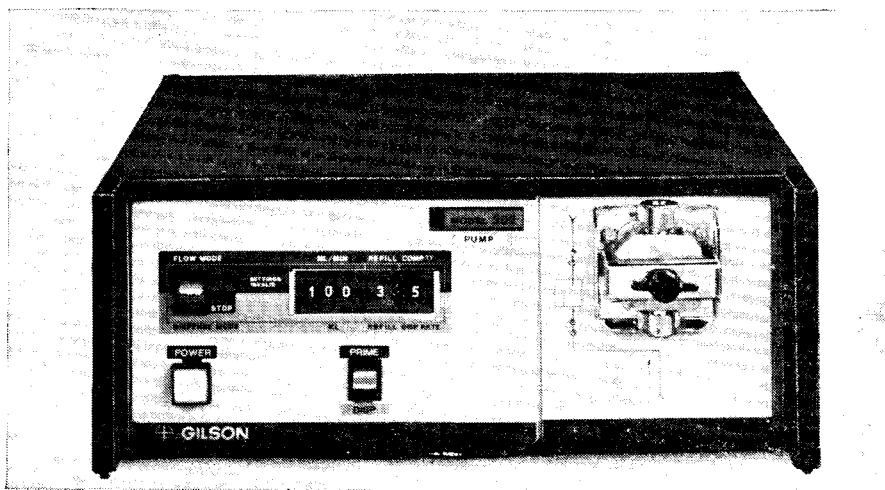


Рис. 50. Насос для ЖХВД фирмы «Gilson» (модель 302)

ме того, здесь существенно снижена минимальная скорость подачи элюента (с 0,1 до 0,001 мл/мин), что позволяет использовать эту модель для работы с колонками диаметром 1 мм и меньше.

Оригинальное решение задачи снижения уровня пульсации найдено фирмой «Biotronik» (рис. 49). Движением общего для двух головок плунжера управляет кулачок сложного профиля, на котором длинный участок постепенного увеличения радиуса сменяется участком быстрого его уменьшения. В положении *A* плунжер под давлением кулачка медленно движется вправо. Жидкость из правой головки поступает в колонку. Клапан 2 закрыт, а клапан 1 открыт. В левую головку жидкость всасывается. Ниже (*B*) изображен момент, когда плунжер быстро идет влево. Клапан 1 под давлением жидкости закрывается, а клапан 2 открывается. Жидкость

быстро перебрасывается из левой головки в правую (и одновременно продолжает поступать в колонку). Затем возобновляется медленная часть цикла подачи жидкости. Общий расход жидкости (0,1—10 мл/мин) регулируется изменением скорости вращения кулачка. Дополнительное достоинство системы состоит в том, что она «не боится» попадания пузырьков воздуха в насос со стороны всасывания (кавитации): при сжатии жидкости в левой головке пузырьки исчезают.

В Чехословакии выпускается плунжерный насос высокого давления VCM-300.

По-видимому, наиболее совершенна сейчас конструкция насоса фирмы «Gilson» (модель 302) (рис. 50). В систему привода введено свободное сочленение плоскостей поступательно перемещающейся траверсы (ее положение задается профилем кулачка) и хвостовика плунжера насоса, который прижимает к траверсе мощная пружина. Благодаря этому исчезает трудная проблема обеспечения строгой соосности привода и плунжера, резко уменьшается износ последнего, а главное — появляется возможность легкой (в течение нескольких секунд) и не требующей специального навыка смены рабочих головок. Набор из пяти сменных головок позволяет с сохранением высокой точности подачи перекрыть очень широкий ее диапазон: от 5 мкл/мин до 100 мл/мин. Так же просто и удачно, с использованием сжимаемой жидкости, решена задача демпфирования остаточных пульсаций после их предварительной электронной корректировки. Рациональная простота конструкции позволила существенно снизить стоимость насоса. Его продажная цена примерно вдвое меньше, чем названных выше насосов других фирм.

### ЗАДАНИЕ ГРАДИЕНТА ЭЛЮЦИИ

В большинстве случаев при ЖХВД используют изократическую элюцию. В качестве резервуара для элюента служит обычная колба или бутылка, куда заливают тщательно очищенный и дегазированный буфер. Ступенчатый градиент осуществляется последовательным подключением на вход насоса нескольких бутылок с помощью многоходового крана. Управление краном по заданной программе можно поручить командному устройству, если таковое имеется в хроматографе, или производить вручную по секундомеру. В хроматографах последних выпусков предусматривается возможность задания непрерывного градиента. Для этого используются не сообщающиеся сосуды, а одновременная подача элюента в смеситель от двух или даже трех (модель 5000 фирмы «Varian») насосов. Соотношение скоростей работы этих насосов определяет форму градиента; оно изменяется по заданной программе под контролем микропроцессора или специального задатчика градиента. Смешивать растворы, образующие градиент, можно и на стороне низкого давления, т. е. на входе насоса. В этом случае можно обойтись одним насосом и системой двух попеременно работающих клапанов, по-

добно тому как это делается в задатчиках градиента произвольной формы для хроматографии низкого давления (типа «Ultrograd» или «Mixograd»; см. выше). Однако гораздо надежнее вести образование градиента с помощью двух насосов и смешивать его компоненты на стороне высокого давления. В этом случае можно точнее осуществить форму градиента, поскольку оба насоса работают непрерывно и объем смесителя может быть малым; кроме того, устраняется опасность кавитаций и образования пузырей газа в смесителе на входе насоса. Наконец, надежная система двух быстродействующих управляемых клапанов, вероятно, стоила бы не меньше, чем второй насос, поэтому в современных хроматографах используется принцип смешивания градиента на стороне высокого давления.

Программное устройство фирмы «Waters» (модель 660) предусматривает возможность задания любого из 11 фиксированных профилей градиента (линейного, двух ступенчатых и по четыре — выпуклых и вогнутых). Экспериментатору достаточно задать начальный и конечный состав смеси буферов, суммарную скорость подачи элюента и время элюции. Существуют варианты и более сложных систем. Например, в хроматографе фирмы «Pye Unicam» (модель PU 4800) задание формы градиента с помощью микропроцессора можно осуществить путем разбиения всего времени элюции на девять произвольных интервалов, внутри каждого из которых любую кривую можно аппроксимировать экспоненциальной функцией. Однако необходимость столь сложных (и дорогостоящих) устройств представляется сомнительной, по крайней мере для решения тех задач, которым посвящена эта книга.

## ДЕТЕКТОРЫ

Детекторы, которыми оснащаются современные жидкостные хроматографы высокого давления, ничем другим, кроме быстродействия, не отличаются от рассмотренных выше устройств для обычной хроматографии. УФ-детекторы, как правило, работают по двухлучевой схеме. Примерно 10 диапазонов чувствительности перекрывают интервал от 0,002 до двух оптических единиц на шкалу. Источником света обычно служит ртутная лампа. Набор длин волн, перекрывающих ультрафиолетовую (от 254 нм) и видимую части спектра, задается сменными светофильтрами. Иногда устанавливаются цинковая и кадмиевая лампы; тогда в этот набор входят также длины волн 214 и 229 нм (модель 441 фирмы «Waters», модель 160 фирмы «Beckman»). Некоторые детекторы оснащаются дополнительными приспособлениями, позволяющими вести регистрацию одновременно на двух длинах волн (с двухканальным регистратором) или записывать поглощение на одной длине волны и отношение поглощений на этой и другой длине волны, например  $A_{254}$  и  $A_{254}/A_{280}$ . Все ведущие фирмы, выпускающие жидкостные хроматографы высокого давления («Waters», «Beckman», «Gilson», «DuPont», «Varian», «Spectra Physics», «Pye Unicam», «Laboratory Data

Control», «Tracor»), дополнительно комплектуют свои приборы быстродействующими спектрофотометрами с широким диапазоном длин волн (190—600 нм) и высокой чувствительностью (например, модель 480 «Lambda-Max» фирмы «Waters» — до 0,001 оптической единицы на шкалу), а также флуоресцентными детекторами. Более подробные данные о целом ряде УФ-детекторов, спектрофотометров и флуориметров были приведены выше.

Недавно фирмы «Beckman» и «LKB» сообщили о выпуске детекторов, осуществляющих регистрацию УФ-спектра поглощения материала, выходящего в хроматографическом пике, «на ходу» — без прерывания элюции колонки (с целью идентификации вещества). Спектр фиксируется в запоминающем устройстве за доли секунды и сразу же может быть записан с помощью дополнительного регистратора. В детекторе модели 165 фирмы «Beckman» использован принцип быстрых колебаний дифракционной решетки, подвешенной в магнитном поле. В приборе «Rapid Spectral Detector» (модель 2140 фирмы «LKB») спектр поглощения элюента непрерывно проецируется на 256 фотодиодов, расположенных по всей длине спектра. Изменения сопротивлений фотодиодов регистрируются и обрабатываются компьютером.

Имеется возможность, например, по окончании хроматографического процесса получить на дисплее или на ленте самописца в изометрической проекции «трехмерную» картину элюции в координатах оптической плотности, времени и длины волны. Более подробные сведения об устройстве и перспективах использования таких детекторов для целей хроматографии можно найти в обзорной статье [Fell et al. — J. Chromatogr., 1983, 273, p. 3—17]. При исследовании белков и нуклеиновых кислот с их простыми, лишенными индивидуальных особенностей УФ-спектрами поглощения особой нужды в этих сложных и дорогостоящих приборах, по-видимому, нет.

Некоторые фирмы комплектуют свои приборы электрохимическими детекторами и детекторами коэффициента преломления. Здесь нет смысла приводить полный список наименований имеющихся на рынке детекторов, тем более что он непрерывно изменяется. Читатель сможет найти эти наименования и технические характеристики в фирменных каталогах.

## АВТОМАТИЗАЦИЯ

Мы перечислили и кратко охарактеризовали основные узлы и приборы, входящие в комплект жидкостного хроматографа высокого давления. Кроме того, современные дорогостоящие приборы оснащаются дополнительными устройствами для автоматизации процесса, задания и хранения в памяти его параметров, обработки полученной информации. К ним относятся разного рода контрольные устройства и микропроцессоры, иногда с возможностью диалога с компьютером, интеграторы-регистраторы, нередко с дисплеем, автоматы для введения многочисленных проб с возможностью их индивидуальной обработки по различным программам. Микропроцессоры позволяют

с помощью клавиатуры вводить в память прибора несколько десятков программ, включающих в себя все параметры, хроматографического процесса: объем препарата, последовательные этапы его градиентной элюции, режимы работы насосов, условия детектирования и регистрации пиков, характер обработки результатов, способ промывки колонки и подготовки ее к следующему фракционированию. Интеграторы записывают пики, подсчитывают их площади, внося коррекцию на дрейф нулевой линии, отдельно обсчитывают «плечи» и неразделившиеся пики, отбрасывая всплески шумов или ложные пики от воздушных пузырей. На ленте самописца и на экране дисплея не только регистрируются сами пики, но и изображается форма градиента, указываются площадь и время задержки каждого пика, отмечаются все условия эксперимента и даже имя экспериментатора. Компьютеру может быть задана даже такая дополнительная задача, как линейаризация калибровочной кривой при гель-фильтрации и подсчет молекулярной массы исследуемого вещества. Автоматы для введения проб на 50—100 образцов по заданной программе отбирают нужные объемы растворов из закрытых флаконов (прокалывая пробки) и вводят их в инжектор.

Вся эта современная техника производит внушительное впечатление и, возможно, необходима для массированных контрольных анализов в промышленном производстве или крупных клиниках. Нам же представляется, что в условиях исследовательской лаборатории степень автоматизации (и расходы на ее осуществление) следует разумно ограничить. К счастью, многие фирмы («Waters», «Beckman», «Gilson» и др.) комплектуют свои приборы из отдельных блоков, в том числе и простых блоков управления, и тем самым предоставляют исследователю самому выбрать рациональную степень автоматизации своей работы. Подробности такой комплектации читатель найдет в каталогах перечисленных выше фирм.

Наиболее удобной для исследовательских целей представляется модульная система фирмы «Gilson» (Франция). Комплектующие ее малогабаритные блоки позволяют осуществить широкий набор комбинаций: от простейшей аналитической системы для изократической элюции (насос, рассчитанный на скорости подачи от 5 мкл/мин до 10 мл/мин, инжектор, УФ-регистратор с фиксированными длинами волн и самописец — рис. 51) до автоматизированной системы градиентной элюции с двумя насосами, УФ-детектором с переменной длиной волны, флуориметром, интегратором-регистратором и программным устройством, в котором использован малогабаритный компьютер с дисплеем общего назначения типа «Apple II». Его, кстати, можно использовать и для других лабораторных целей (рис. 52). Имеются и соответствующие препаративные варианты с надежными и малогабаритными коллекторами фракций. Разработчики фирмы «Gilson» сумели создать тщательно продуманные, а потому относительно простые и надежные конструкции, отвечающие, тем не менее, самым высоким требованиям. Благодаря этому стоимость хроматографических комплектов фирмы «Gilson» примерно вдвое ниже, чем аналогичных изделий других фирм.

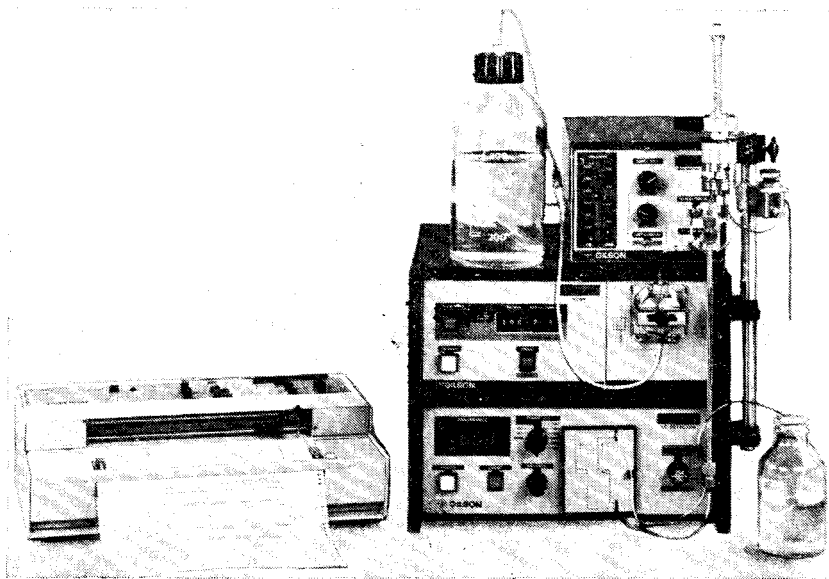


Рис. 51. Простейший набор модулей для ЖХВД фирмы «Gilson»

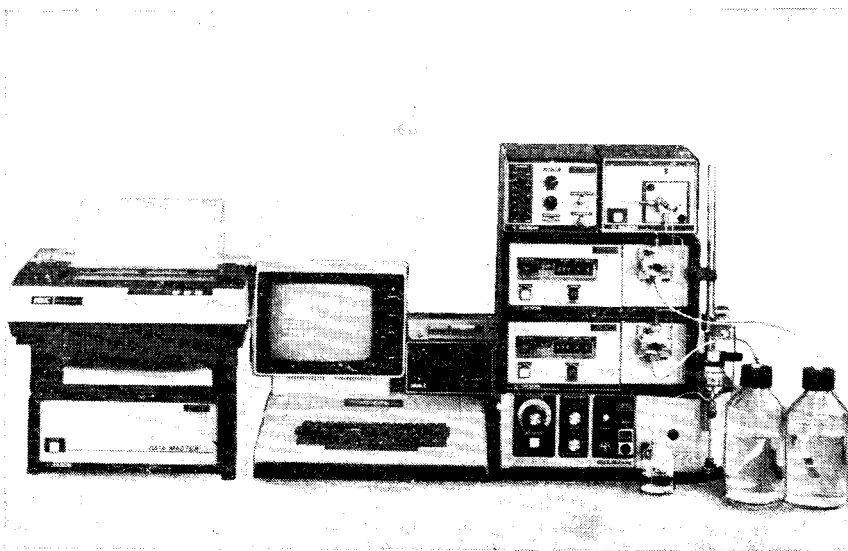


Рис. 52. Автоматизированная система градиентной элюции для ЖХВД фирмы «Gilson»

Для исследования белков, нуклеиновых кислот и их фрагментов большой интерес представляют принципиально новые подходы к осуществлению высокоэффективной хроматографии, развиваемые фирмами «LKB» и «Pharmacia». По аналогии с предыдущим эти подходы можно условно объединить названием «жидкостная хроматография при умеренном давлении». Рассмотрим отличительные особенности и технические аспекты такой хроматографии.

## ХРОМАТОГРАФИЯ ПРИ УМЕРЕННОМ ДАВЛЕНИИ

Если исходить из целесообразности разработки на базе ЖХВД новой стратегии для хроматографии биополимеров, то в ее основу, по-видимому, можно заложить следующие предпосылки.

1. Необходимо использовать сферические сорбенты с диаметром гранул порядка 10 мкм при минимальном разбросе значений диаметра.

2. Сорбенты должны быть крупнопористыми, с тем чтобы максимально облегчить диффузию макромолекул внутрь гранул, и все же достаточно жесткими.

3. Хотя сохранение относительно высокой скорости фракционирования в случае лабильных белков желательно, в лабораторной практике можно согласиться с тем, что хроматография длится несколько часов.

4. В связи с этим можно ограничиться использованием умеренных давлений (30—50 атм) и допустить более высокий, чем при ЖХВД, уровень пульсаций.

5. Следует ориентироваться на хроматографию в водно-солевых средах и в связи с этим по возможности заменять сталь (из-за опасности коррозии) другими, более стойкими материалами.

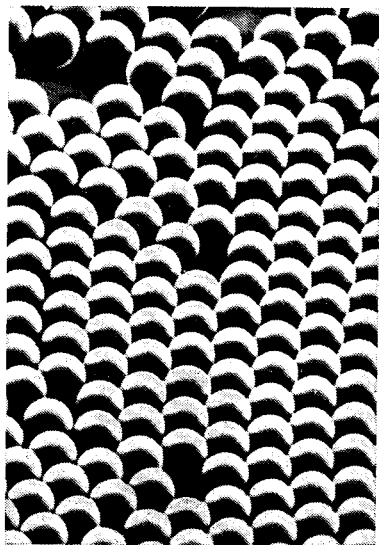
Фирма «LKB» первой вступила на этот путь. В 1982 г. она начала производить несколько типов стальных колонок, заполненных сорбентами с диаметром гранул  $10 \pm 2$  мкм, под общим наименованием «голубые колонки» («LKB Blue Columns»). Название «голубые» говорит лишь о наружной окраске, позволяющей отличать их с первого взгляда. Сначала появились колонки серии 2135 для гель-фильтрации (типа «Ultropak TSK») с тремя различными размерами пор, немного позднее — колонки серии 2133 для ионообменной хроматографии типов «TSK 535 CM» (катионообменники) и «TSK 545 DEAE» (анионообменники). Аналитические колонки каждого типа имеют диаметр 7,5 мм, препаративные — 21,5 мм. Подробнее характеристики таких колонок рассмотрены в последующих главах; здесь же отметим, что их применение позволило получить (по рекламным данным) значительный выигрыш в разрешающей способности, особенно при гель-фильтрации белков. Скорости элюции при этом были значительно ниже, чем при ЖХВД (от 1,2 до 14 мл/см<sup>2</sup>·ч). Данных о давлении фирма не приводит, но подчеркивает, что для фракционирования биополимеров удобно использовать новый насос плунжерного типа той же фирмы («LKB 2150 HPLC pump»), оснащенный го-

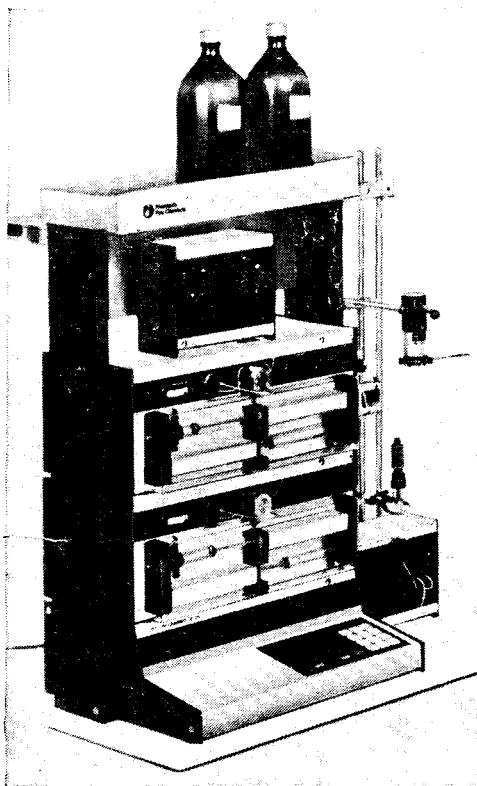


**Рис. 53.** Микрофотография нового сорбента типа «Monobeads» фирмы «Pharmacia»

ловкой с керамическим покрытием и развивающий давление до 100 атм (со сменной стальной головкой — до 350 атм). Защита от коррозии в водно-солевой среде путем использования керамических покрытий рабочих частей насоса — довольно смелое решение, но здесь, как и во всяком новом подходе, не следует торопиться с выводами до того, как будут получены надежные данные по длительной эксплуатации насоса. В литературе появились сведения об успешном использовании новых колонок фирмы «LKB» для фракционирования белков при низких давлениях (в сочетании с перистальтическим насосом «Microperplex» той же фирмы). Такое фракционирование занимает несколько часов, но качество его заметно выше, чем при обычной хроматографии на сорбентах с более крупными гранулами.

Фирма «Pharmacia» со своей новой системой, названной «FPLC» («Fast Protein Liquid Chromatography»), только вступает на рынок биохимической аппаратуры, но, судя по представленным фирмой экспериментальным данным, ей удалось сделать весьма большой шаг вперед (подробнее — см. гл. 7). В названии новой хроматографической системы фигурирует слово «быстрая», а это находится в видимом противоречии с одной из сформулированных выше предпосылок. Впрочем, уже было отмечено, что высокая скорость хроматографического процесса остается желательной, хотя ею и можно поступиться. Если фирме «Pharmacia» удалось обойтись без этой уступки, то дело, видимо, в том, что ее специалисты сумели создать совершенно новый тип сорбента (пока что — только для ионообменной хроматографии) с уникальными свойствами. Сорбенту присвоено общее название «Monobeads». Детали его строения и химической природы пока неизвестны, но некоторые опубликованные фирмой данные оставляют большое впечатление. В первую очередь, это относится к такому важнейшему параметру, как однородность размеров гранул; от нее сильно зависит разрешающая способность любой колонки. Из рис. 53 видно, что на глаз невозможно обнаружить какой-либо вариации диаметров гранул нового сорбента (напомним, что для своих новых сорбентов фирма «LKB» указывает вариацию  $\pm 20\%$ ). Специалисты фирмы «Pharmacia» утверждают, что диаметры гранул их новых ионообменников укладываются в интервал  $10 \pm 0,1$  мкм (вариация  $\pm 1\%$ ). То обстоятельство, что в новой хроматографической системе удается весьма успешно фракционировать белки за 5—20 мин, позво-





**Рис. 54.** Комплект приборов системы «FPLC» для хроматографии при умеренном давлении (фирма «Pharmacia»)

полняется; потом они «меняются ролями». Автоматический поворотный кран (в центре сверху) соответственно переключает течение жидкости по тефлоновым трубкам. В момент переключения срабатывает специальная система, подавляющая пульсацию. Использование двухплунжерной схемы позволяет работать в широком диапазоне давлений, так как освобождает от необходимости использовать шариковые клапаны. Скорость подачи элюента можно регулировать в пределах 1—499 мл/ч. Контрольное устройство выключает насос, если давление в системе превысит наперед заданное предельное значение.

Для создания градиента элюции используют два насоса. Смеситель с магнитной мешалкой устанавливают на стороне выхода из насосов. Он изготовлен из пластика и рассчитан на давление до 50 атм; объем его камеры — 0,6 мл. Имеется возможность задания профиля элюции любой формы в виде последовательности линейных градиентов

ляет предположить, что сорбент должен быть очень крупнопористым, а то, что его емкость в несколько раз выше, чем у DEAE-сефарозы CL-6B, свидетельствует о равномерном распределении ионогенных групп по объему гранул.

Из всего комплекта приборов для «FPLC» (рис. 54) нам знаком только двухлучевой УФ-детектор типа UV-1. В средней части стойки расположены два насоса нового типа — «Pump P-500». Это — насосы плунжерного типа (рис. 55), рассчитанные на создание давления до 40 атм; тем не менее, их рабочие цилиндры выполнены из боросиликатного стекла (смелое, но апробированное решение проблемы коррозии). Изготовленные из титана плунжеры уплотнены усиленным фторопластом. Никакие другие материалы не контактируют с жидкостью. Два плунжера работают поочередно: в то время как один из них подает элюент на колонку, цилиндр второго за-

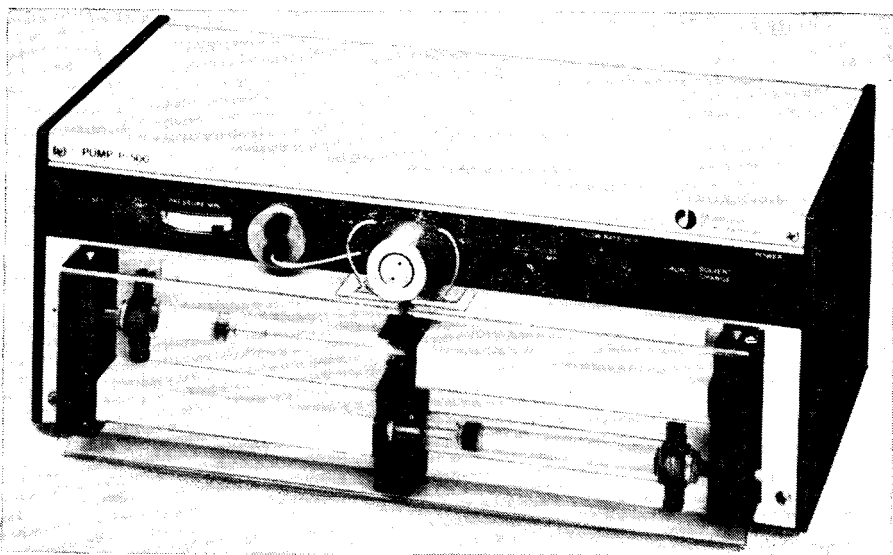


Рис. 55. Насос плунжерного типа Р-500 (фирма «Pharmacia»)

и изократической подачи элюента на участках, которые можно произвольно выбрать вдоль всего рабочего цикла. Этой цели служит программное устройство («Gradient programmer», GP-250 — см. рис. 54, внизу). С помощью клавиатуры (по времени или по объему элюента) задается разбиение на участки и процентное соотношение объемов двух буферов в начале и конце каждого участка. Профиль градиента записывается на ленте регистратора. В случае необходимости его можно корректировать в ходе элюции. Программное устройство управляет также работой коллектора фракций, регистратора, клапанов и инжектора. Десять различных программ такого рода могут храниться в памяти прибора.

Специально разработанный для работы с биологическими объектами инжектор поворотного типа также хорошо виден на рис. 54 — справа, над колонкой. Все его смачиваемые поверхности изготовлены из полиимида, устойчивого как к водно-солевым средам, так и к органическим растворителям. Вместе с тем инжектор рассчитан на давление до 100 атм. Он комплектуется петлями для препарата объемом 50, 100, 200 и 500 мкл. Кроме того, оригинальное устройство («Superloop») позволяет через инжектор вводить на колонку под давлением от насоса объемы до 50 мл.

На рис. 54 внизу справа, в непосредственной близости от оптического блока УФ-детектора, можно видеть саму хроматографическую колонку. Фирма «Pharmacia» не продает свои новые сорбенты отдельно, а только упакованными в колонки объемом 1 мл. Они изготовли-

ваются из толстостенного стекла — этим завершается обеспечение антикоррозийной устойчивости всего хроматографического тракта.

Вероятно, и в данном случае с окончательным суждением о достоинствах новой хроматографической системы следует подождать до тех пор, пока накопится достаточный опыт ее эксплуатации, но нельзя не оценить того обстоятельства, что она сконструирована специально для исследования биологических макромолекул. Разумеется, новый комплект приборов фирмы «Pharmacia» можно использовать не только с колонками этой же фирмы. В свете высказанных выше соображений о специфике хроматографии биополимеров надо полагать, что он найдет себе применение и в сочетании с появляющимися сейчас сорбентами на основе крупнопористых силикагелей.