

Август

2005



УМЧЕСКИЙ
НАУЗ

Редактор

К.С. Сычев

Рецензенты

Э.Л. Гоголашвили

Л.В. Сапрыкин

С.Н. Сычев

А.В. Удалов

Е.К. Федоров

ВЭЖХ с переключением колонок и твердофазной экстракции on-line

Евгений К. Федоров

Слово от редактора

"Многомерная" техника ВЭЖХ эксперимента в настоящее время достаточно динамично развивается, пытаясь по своей эффективности догнать подобную технику в газовой хроматографии, в которой многомерные (multidimensional) методы давно стали рутинными. Вкратце, идея многомерного (в самом простом случае - двумерного, 2D) метода состоит в последовательном разделении пробы на нескольких (по крайней мере, двух) хроматографических колонках по разным механизмам.

Цели, для достижения которых может эксплуатироваться идея многомерного метода, очень разнообразны: разделение чрезвычайно сложных смесей, экспресс-анализ нескольких аналитов в чрезвычайно сложных матрицах, концентрирование целевых аналитов, хиральный анализ сложных смесей и т.д.

Пока успехи в этой области немного затормаживаются из-за чисто технических сложностей, но есть надежда, что более-менее вскоре эти трудности будут преодолены. Статья Евгения Федорова посвящена краткому обзору основных техник многомерного ВЭЖХ метода.

1. [Статья](#)

2. [А.В. Удалов. Рецензия на статью](#)

3. [К.С. Сычев. Рецензия на статью](#)

Уважаемые коллеги!

Не претендуя на полноту, хотел бы обобщить некоторый личный опыт и литературные сведения об использовании переключающих клапанов высокого давления в современной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Сразу оговорюсь, что так называемую on-line твердофазную экстракцию (ТФЭ) я буду рассматривать только как один из вариантов ВЭЖХ с переключением колонок, отличающийся небольшими размерами и сравнительно низкой эффективностью первой колонки, в роли которой выступает экстракционный патрон. Не стану подробно останавливаться на применении переключающих клапанов для программированного выбора колонок, подключенных к одному прибору с целью последовательного проведения разных анализов или оптимизации хроматографических параметров. Это лишь способ повышения производительности труда, не дающий ничего нового для конкретного хроматографического разделения.

Предметом данного обсуждения будут лишь такие схемы, которые позволяют в рамках одного хроматографического разделения (закола) достичь с помощью двух и более колонок и одного и более переключающих клапанов какого либо существенного улучшения хроматограммы. Чаще всего это либо избавление от посторонних пиков, либо улучшение разрешения между двумя или большим числом пиков без значительного увеличения времени анализа.

В самой простой схеме с переключением колонок (простейший вариант on-line ТФЭ) первая из них, низкоэффективный экстракционный патрон с небольшим сопротивлением потоку, ставится вместо петли ввода в петлевом дозаторе. Цель - в момент ввода пробы удерживать анализируемые вещества и пропустить ненужные примеси. Первой причиной того, что эта простейшая схема не получила

широкого распространения, является тот факт, что для полного удаления слабоудерживаемых примесей нужна промывка первой колонки (патрона) дополнительным объемом слабого элюента, то есть, как минимум один дополнительный закол до переключения клапана. При использовании ручного ввода это, в принципе, не вызывает дополнительных трудностей и лишь требует времени, автоматические же устройства ввода пробы (автосамплеры) обычно невозможно запрограммировать на выполнение такой нестандартной операции. Вторым существенным недостатком по сравнению со следующей схемой в том, что риск последовательного загрязнения проб (carry-over) выше из-за того, что более высокое, чем у петли ввода, сопротивление потоку может вызвать подтекание уплотнения иглы в клапане ввода. Некоторые автосамплеры (например Shimadzu последних моделей) вообще не позволяют реализовать подобную схему.

Другой схемой, получившей наибольшее распространение (см. рис. 1), является вариант, когда первая колонка (ТФЭ патрон) устанавливается на шестиходовом двухпозиционном переключающем клапане таким образом, что в первом положении она оказывается между насосом 1 и сливом, а во втором - между насосом 2 и второй колонкой, которая, в свою очередь, подключена к детектору. Эта схема осуществляет ту же задачу, что и первая, с той лишь разницей, что элюирование посторонних слабоудерживаемых веществ с первой колонки осуществляется первой подвижной фазой, подаваемой первым насосом высокого давления. Непосредственно перед выходом с первой колонки целевых веществ клапан переключают и на ее вход поступает вторая подвижная фаза со второго насоса высокого давления, элюирующая эти вещества на вторую колонку для продолжения хроматографического разделения. Обычно вторая подвижная фаза - значительно более сильный элюент, чем первая, по отношению к целевым веществам на первой колонке, а размеры второй колонки значительно превосходят размеры первой, но это вовсе не обязательно. После выхода последнего из целевых веществ с первой колонки клапан можно снова переключить в первое положение и отсечь, таким образом, те нежелательные вещества пробы, которые иначе вышли бы со второй колонки значительно позже, увеличив общее время анализа.

Подобная схема может быть реализована как в режиме ТФЭ с относительно "грязной" пробой и низкоэффек-

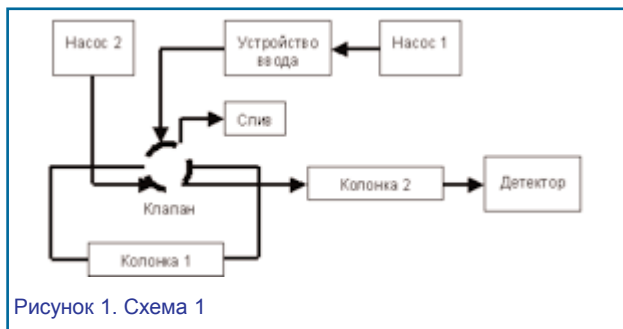


Рисунок 1. Схема 1

тивным патроном, так и для улучшения избирательности ВЭЖХ анализа с закомом пробы, уже прошедшей предварительную экстракцию, с использованием только высокоэффективных колонок. Моей целью не является обзор сорбентов, применяемых для ТФЭ, скажу лишь, что последнее время появилось много новых, пригодных для ввода весьма "грязных" проб, в том числе и биологических. Это и так называемые сорбенты с ограниченным доступом в поры (RAM) и с молекулярным импринтингом (MIP), и колонки с турбулентным потоком. Общая трудность - отсутствие хороших автосамплеров для ввода подобных проб, обеспечивающих низкий уровень последовательного загрязнения (белки, например, способствуют сорбции многих целевых веществ на игле, а смыть их непросто).

Другая сложность связана с тем, что число закомов, которые можно выполнить без смены патрона, обычно исчисляется лишь десятками, редко достигая одной-двух сотен, что не всегда достаточно для лабораторий, занимающихся анализами на потоке. Да и степень очистки от посторонних примесей в этом режиме не всегда достаточна для получения хорошей хроматограммы на выходе второй колонки. В этом случае рассматриваемая схема может оказаться важным подспорьем для более полного отделения примесей уже после предварительно проведенной грубой экстракции. При этом обе колонки могут быть наполнены высокоэффективным сорбентом с размером частиц 5 или 3 мкм. В качестве первой колонки весьма удобно использовать короткие и относительно дешевые предколонки длиной 10-20 мм и диаметром от 2 до 4.6 мм.

Стоит отметить, что применение этой схемы отнюдь не ограничивается лишь обращенно-фазным вариантом, она прекрасно работает и в нормальной фазе. В некоторых случаях возможно также объединение обращенно-фазной или ионообменной хроматографии на первой колонке с разделением по механизму с полярными взаимодействиями (HILIC) на второй.

Естественно, любая схема с переключением колонок предъявляет повышенные требования к воспроизводимости времен удерживания, что зависит от качества насосов, дегазации элюентов, качества колонок и стабильности температуры. К недостаткам этой схемы следует отнести, во-первых, риск все того же последовательного загрязнения проб, проявляющегося иногда за счет неполного элюирования целевых веществ с первой колонки на вторую. В этом случае следующий заком может содержать следы анализируемых веществ из предыдущего закола, удержанных изначально (например, на остаточных силанольных группах в узких порах) и медленно десорбируемых. К сожалению, это может оказаться настоящей проблемой при больших диапазонах концентраций. Даже многократное переключение клапана не всегда позволяет полностью смыть целевое вещество с первой колонки, так как скорость смыва его следов может ограничиваться диффузией в узких порах. Другой недостаток - некоторое увеличение времени ВЭЖХ анализа по сравнению с идеально чистой предварительной экстракцией, если таковая возможна.

Как уже упоминалось, обратное переключение клапана сразу после смыва целевых веществ с первой колонки позволяет избавиться от сильноудерживаемых

нежелательных примесей. Однако, если селективность первой колонки во второй подвижной фазе невелика, на второй колонке время выхода всех пиков может оказаться значительным. Если последние пики не представляют аналитического интереса, их можно поджать, например, ступенчатым градиентом, но это потребует уравнивания колонки с первоначальным составом подвижной фазы, и, следовательно, приведет к удлинению анализа.

Если поместить еще одну колонку между инжектором и переключающим клапаном (рис. 2), можно синхронизировать его переключение таким образом, чтобы на последнюю колонку, и, следовательно, на детектор попали только целевые вещества. При правильном подборе первых двух колонок и первой подвижной фазы слабоудерживаемые примеси успеют к моменту переключения элюироваться в слив, сильноудерживаемые останутся на первой колонке и уйдут в слив после переключения, а узкая фракция, подлежащая дальнейшему анализу, попадет на третью колонку. Эта схема получила название "хроматографической лупы" (heart cutting chromatography). Данная схема может оказаться незаменимой при делении близких по свойствам веществ, например, изомеров, если требуется обеспечить высокую производительность.

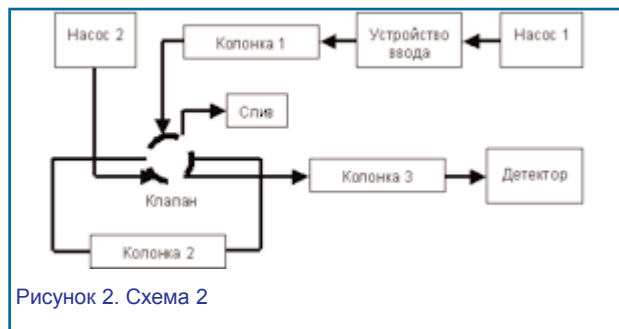


Рисунок 2. Схема 2

Задача существенно упрощается, если требуется отделять не слабоудерживаемые вещества, а лишь сильноудерживаемые примеси с целью сокращения времени анализа.

Это нередко случается после предварительной экстракции. В этом случае используется двухколоночная схема с одним клапаном, но в момент ввода пробы обе колонки соединены последовательно и через них прокачивают подвижную фазу (рис. 3). Как только подлежащие дальнейшему анализу вещества элюируются с первой колонки, клапан переключают, выводя эту колонку в линию промывки более сильным элюентом от второго насоса на слив. Причем эту промывку можно осуществлять двояко: либо в том же направлении, либо в противотоке, поменяв местами линии от второго насоса и на слив, если примеси уж очень сильно удерживаются. Данный вариант хорош еще и тем, что при его использовании не возникает проблемы с последовательным загрязнением проб.

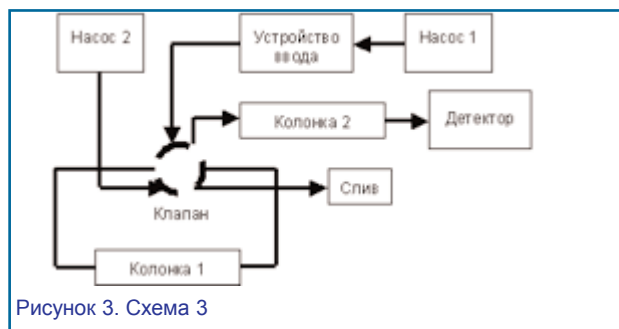


Рисунок 3. Схема 3

При благоприятном стечении обстоятельств и правильном подборе колонок эту схему можно еще упростить, оставив единственный насос (рис. 4). В этом случае первую колонку не выводят в промывочную линию, а переключают, помещая ее между второй колонкой и детектором, элюируя таким образом примеси до выхода основных пиков со второй колонки (также в прямоточном или противоточном варианте).

Точно такую же схему с одним насосом, одним клапаном и двумя колонками можно применить для оптимизации разделения смеси с сильно отличающимися по полярности анализируемыми компонентами.

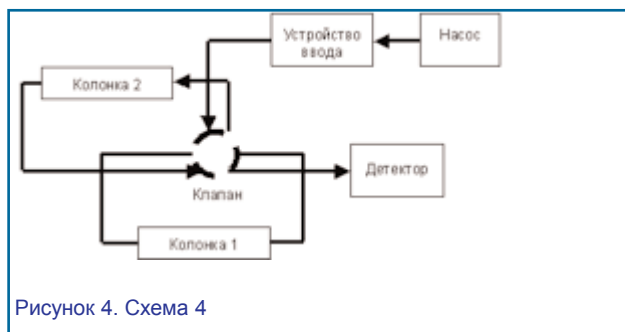


Рисунок 4. Схема 4

Обычно для этих целей применяется градиент, но, как уже говорилось, после градиента требуется время на уравновешивание. Допустим, есть два близких по свойствам сравнительно полярных вещества и одно малополярное. Для разделения первых двух требуется длинная колонка, но третье в той же подвижной фазе выйдет с нее очень не скоро. Данная схема позволяет элюировать с первой колонки на вторую эти два еще не разделенных вещества, переключить клапан, поместив первую колонку с третьим веществом после второй, и продолжить разделение. При правильном подборе колонок и подвижной фазы третий пик выйдет первым на детектор, пройдя только через первую колонку, а первые два успешно поделятся, пройдя последовательно через первую, вторую и снова первую колонку. Таким образом можно оптимизировать многие градиентные хроматографические разделения, сократив время анализа, по меньшей мере, вдвое.

На основе этих базовых схем переключения колонок можно создавать более сложные, с использованием двух клапанов, позволяющие, например, комбинировать принцип "хроматографической лупы" с опережающим противоточным смывом сильноудерживаемых примесей с первой из трех колонок.

Необходимые для переключения колонок клапаны высокого давления выпускаются фирмами Rheodyne и Valco и продаются многими производителями колонок и хроматографического оборудования. Все упомянутые схемы реализуются с помощью шестиходовых клапанов на два положения с тремя сегментными канавками в роторе. Существуют и более хитроумные переключающие клапана, но они менее универсальны.

Как уже упоминалось, главным недостатком on-line ТФЭ на переключающем клапане является невозможность смены патрона после каждого анализа, что увеличивает шансы подцепить последовательное загрязнение. Еще в начале 90-х годов прошлого века голландская фирма Spark выпустила на рынок прибор Prospekt, в котором эта смена осуществлялась автоматически после заданного числа анализов. Помимо пневматического зажима для патронов и системы их подачи, прибор был снабжен четырьмя шестиходовыми клапанами фирмы Rheodyne, насосным модулем с шестиходовым клапаном низкого давления и микропроцессором, позволяющим программировать все это хозяйство. Этот прибор, его более поздний вариант Prospekt-2 и современный Symbiosis позволяют реализовать самые сложные схемы твердофазной экстракции с самыми

сложные схемы твердофазной экстракции с самыми разнообразными промывками.

В то же время, даже несмотря на наличие на рынке подобного прибора, предварительная экстракция не сдает свои позиции и, пожалуй, в области высокопроизводительного анализа по-прежнему доминирует. Причин тому несколько. Как уже отмечалось, несмотря на возможность смены экстракционного патрона, использование автосамплера для непосредственного ввода биологических проб по-прежнему остается источником последовательного загрязнения. Цена прибора Symbiosis и, в особенности, патронов к нему, довольно велика. Даже если пробоподготовку следующего образца проводить одновременно с хроматографическим разделением предыдущего, все равно общее время анализа оказывается чаще всего больше, чем если закалывать предварительно проэкстрагированные пробы, что снижает производительность. А использование современных высокопроизводительных роботов для ТФЭ позволяет существенно снизить затраты времени и сил на проведение предварительной экстракции.

В конечном итоге, для создания надежных и высокопроизводительных методик ВЭЖХ важно уметь оптимально сочетать преимущества предварительной экстракции и хроматографии с переключением колонок.

Примечание редактора: в качестве дополнение в статье беру на себя ответственность опубликовать некоторые неофициальные комментарии Евгения по поводу техники твердофазной экстракции.

У самой фирмы Spark Holland есть сайт <http://www.sparkholland.com/>, но технически он малоинформативен, разве что позволяет затребовать литературу - постеры, рекламные проспекты и примеры использования, но для этого надо зарегистрироваться. Технические подробности неплохо изложены в следующей статье: <http://www.lcgeurope.com/lcgeurope/article/articleDetail.jsp?id=10001>

Это на примере Prospekt-2 (этот прибор используется также фирмой Брукер в ЖХ-ЯМР интерфейсе для замены растворителя на дейтерированный: <http://www.bruker-biospin.de/NMR/hyphenation/spe/lcspenmr-details.html>).

Symbiosis, в принципе, тот же прибор, только уже с хроматографом в придачу:

http://spark.asweb.nl/upload/nieuws_nieuws_documentatie_23.pdf

Набор патронов можно посмотреть здесь:

http://spark.asweb.nl/download/pdf/sorbents_info_sheet.pdf

а также здесь:

<http://www.speware.com/prospektMS.html> (на фотографии первая модель Prospekt, ее раскруткой в свое время занималась фирма Varian, но сейчас Spark Holland все делает сама). Еще несколько ссылок:

<http://www.waters.com/WatersDivision/pdfs/LCMS96MB2.pdf>

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/awacss/results/CSICArticleJChromA.pdf>

<http://www.pharma.tno.nl/Common/pdf/pharmaposter003.pdf>

[http://projects.dhi.dk/artdemo/Publications/Lopez%20Roldan%20OP%20et%20al%20\(2004\)%20Simultaneous%20determination%20of%20selected%20endocrine%20disruptors%20\(pesticides,%20phenols%20and%20phthalates\).pdf](http://projects.dhi.dk/artdemo/Publications/Lopez%20Roldan%20OP%20et%20al%20(2004)%20Simultaneous%20determination%20of%20selected%20endocrine%20disruptors%20(pesticides,%20phenols%20and%20phthalates).pdf)

Основной недостаток - высокая цена и, как ни странно, интегрированность с хроматографом. Все-таки автоматизированная off-line экстракция с использованием лабораторных роботов и экстракционных пластин на 96 гнезд гибче и удобнее при массовом производстве анализов, поэтому получает большее распространение, несмотря на дороговизну. Да и адаптация ручных методик с переходом к роботам, имитирующим ручную работу, значительно проще, а on-line экстракцию надо чаще всего разрабатывать по новой, и, как Вы правильно отметили в обзоре, у нее масса ограничений.

Что же касается автоматизированной off-line экстрак-

ции, то здесь два основных подхода к пипетированию - сразу на 96 наконечников с общим приводом или вплоть до 8 наконечников с отдельным приводом и контролем уровня.

Первый подход наиболее полно реализован фирмой Tomtec: <http://www.tomtec.com/Pages/Q320SPE.html>

Главный недостаток этого подхода - риск неконтролируемого сбоя в каком-то из каналов (засор, пузырь), что ведет к отсутствию нормального пипетирования в этом канале и потере образца. Кроме того, велик риск перекрестного загрязнения проб из-за возможных брызг (именно это, по-видимому, было причиной серьезных проблем у фирмы MDS, о чем я писал в форуме <http://www.anchem.ru/forum/read.asp?id=832>

Второй подход лучше всего развит фирмой Packard, пару лет назад поглощенной фирмой Perkin-Elmer: <http://las.perkinelmer.com/content/ApplicationNotes/p10618-fullyautomatedspeapplicationusingmultiprobegripper.pdf>

Емкостной датчик уровня жидкости, сенсором которого является проводящий наконечник пипетки (все 8 пипеток механически и гидравлически независимы), позволяет динамически адаптировать глубину погружения наконечника к уровню жидкости, контролировать завершенность не только каждого этапа пипетирования, но и просасывание через гнезда адсорбционной пластины, минимизируя ошибки и разбрызгивание. В жертву, правда, приносит производительность, по сравнению с системами на 96 наконечников.

Лабораторные роботы для ТФЭ выпускают и другие фирмы: Tecan, Hamilton, Gilson, Beckman Coulter, Lear Technologies, Caliper (бывшая Zymark), некоторые из них ориентированы на отдельные патроны (http://www.caliperls.com/pdf/DataSht_TA1.pdf).

В последнее время появились и мелкие новички с весьма интересными ценами. Кстати, упоминавшиеся мной пробирочные испарители также выпускает фирма Caliper (бывшая Zymark), она же продает и испарители для пластин на 96 гнезд.

А.В. Удалов. Рецензия на статью Евгения К. Федорова "О ВЭЖХ с переключением колонок и твердофазной экстракции on-line"

Автором затронута несомненно актуальная тема оптимизации технологии производства сложного хроматографического анализа. Способы объединения части пробоподготовки с собственно хроматографическим разделением в один технологический процесс весьма важны для лабораторной практики. Соответственно, в подобной статье хотелось бы видеть более близкие к практике рекомендации, а именно применимость той или иной схемы анализа для различного круга задач и объектов.

Позволю себе выразить некоторые соображения по представленной статье.

1. Мне представляется, что любые схемы on-line ТФЭ имеют весьма ограниченную применимость для ненаправленного скрининга следовых количеств веществ в сложной матрице, например, для определения метаболитов наркотических и других сильнодействующих веществ в биологических жидкостях. Для десорбции аналитов с первой (концентрирующей) колонки требуется существенное количество сильного элюента, как минимум, равное двум мертвым объемам (V_d), т.е. примерно 0,2 V_d второй (разделяющей) колонки. В случае применения аналогичных сорбентов в двух колонках проба "размажется" по 20% длины разделяющей колонки, что приведет к уширению пиков, недопустимому для анализа следов. Таким образом, в рассматриваемом случае возможно использование первой и второй колонок только с такими сорбентами, для которых сильный для первой колонки элюент оказывается слабым для второй.

2. Рассматриваемый автором простейший вариант - включение концентрирующей патрона вместо дозирующей петли предполагает, что проба вводится либо первым

насосом, либо дополнительным краном дозатором. Первый вариант позволяет достигнуть высокого коэффициента концентрирования, но требует применения 3-х или 4-х насосов. 1 - ввод большого объема пробы, 2 - промывка патрона слабым элюентом, 3, 4 - элюирование с концентрирующей колонки и создание градиента на разделяющей. Т.е. описанная простота весьма обманчива.

3. Вызывает некоторое удивление, что "хроматография вырезания сердцевин" (heart cutting chromatography) или "хроматографическая лупа" в ВЭЖХ все еще является предметом обсуждения, тогда как совершенно аналогичный подход в ГХ под названием "метод переноса пиков" был предложен Виллалобосом и развит Динсом еще в 60-е годы прошлого века и серийно реализуется как в лабораторных, так и в промышленных хроматографах. (Гишон Ж., Гийемен К. "Количественная газовая хроматография". М.: Мир. 1991)

4. Рассмотрение иллюстраций подтверждает тезис "труднее всего объяснять очевидные вещи". Автор, имеющий богатый опыт в реализации сложных схем ВЭЖХ анализа, не учитывает, что не каждый читатель поймет его с полуслова. Как идут потоки через "клапан", который правильнее было бы назвать краном? По тексту "клапан" - шестиходовой. Тогда предполагаем, что концы дуг на схеме (их - 6) это соответствующие "ходы". Тогда из колонки 1 элюент течет куда-то в седьмой вход и уходит в слив. Из насоса 2 элюент уходит в пустоту, а в колонку 2 ничего не поступает?

В целом же, статья нужная, а при условии конкретизации областей применимости рассматриваемых приемов и улучшения качества иллюстраций ее информативность и наглядность значительно повысится.

К.С. Сычев. Рецензия на статью Евгения К. Федорова "О ВЭЖХ с переключением колонок и твердофазной экстракции on-line"

Статья интересная и очень мне понравилась. Примеров, действительно, нет - это отмечал не только Андрей Удалов. Это, безусловно, минус, если рассматривать статью как учебную. Если же смотреть "с моей колокольни", то все рассказано содержательно, скажем, без излишних подробностей. Так что эту статью можно сейчас принять как есть, а в дальнейшем написать более подробную статью для пользователей, в которой бы приводилось много конкретных примеров разделений. Таково мое предложение.

Вообще говоря, стоит пояснить, почему такие довольно хитроумные системы имеют право не только жить, а интенсивно развиваться.

Хроматографические методы все надежнее входят в процессы различных производств, на разных ступенях аналитического контроля. Очень часто оказывается, что поставленные задачи требуют весьма комплексной и дорогостоящей техники, и, более того, даже последней хватает далеко не всегда. Попытка экстенсивного решения проблемы, путем усложнения оборудования, в какой-то момент превращается в безумную гонку, где небольшое увеличение эффективности выходит увеличением цены в разы (а это, бывает, десятки тысяч долларов).

Смысл систем с переключением колонок заключается в том, чтобы потратив, допустим, 2 тысячи долларов и применив немного хитроумности, сэкономить 20 тысяч.

К примеру, тот же скрининг фармацевтиков в биологических объектах. Тут я немного не согласен с Андреем Удаловым - как раз такие задачи могут очень красиво решаться системами с переключением колонок. Да, скрининг удобно вести градиентом на одной высокоэффективной микроколонке, допустим, 250x2 С18 высокой чистоты (обращенно-фазовый режим). Но "интересные участки" можно одновременно "просматривать" и на второй колонке, например, силикагеле (гидрофильный режим). Причем ни одна хроматограмма не будет прерываться. Все это можно устроить, поставив на выходе

из первой колонки сплиттер (делитель потока) 1:1, один выход которого идет на детектор, а другой - на концентрирующий патрон, и далее на линию со второй колонкой. Кажется, что сложно и дорого? Оказывается, нет. Фактически, работают два соединенных простых прибора. Которые оказываются гораздо эффективнее одной "навороченной" стандартной системы (и даже дешевле, если начать считать).

Кроме того, есть ряд задач, которые принципиально нельзя решить без применения описанных систем. Типичный пример - определение энантиомерного состава аналитов, содержащихся в следовых количествах в сложных матрицах. То есть три в одном - хиральный анализ, следовые количества, сложные матрицы. Например, исследования кинетики превращений при производстве вин. Кроме системы с переключением колонок, рецептов вообще больше нет.

По поводу систем с он-лайн концентрированием у меня есть некоторые свои убеждения. В стандартной системе картридж стоит перед колонкой, то есть все сначала концентрируется, а потом вводится в колонку. Считаю, что эта схема нецелесообразна, если для он-лайн концентрирования применяется неселективный материал (то есть не импринтный, и не аффинный).

Получается, что вся грязь точно так же концентрируется. Где же тут сильное преимущество?

Одним словом, я считаю схему 2 "хроматографической лупы" наиболее перспективной. Картридж (колонку 2 на схеме) надо ставить между двумя колонками - первой, дешевой и низкоэффективной (колонка 1), и второй, рабочей и высокоэффективной (колонка 3). На первой основная "грязь" быстро отделяется от узкой фракции, содержащей аналиты; уже эта относительно чистая фракция поступает на концентрирование. По этой схеме вообще можно не делать пробоподготовку, а просто поставить перед первой колонкой еще предколонку. Опять же кажется сложно и дорого, и опять это впечатление обманчиво. По цене получается дешевле; "расходным материалом" являются дешевые предколонки, а затрат на подготовку пробы вообще нет (так как она оказывается ненужной).

Но это все, скажем, пока только логические построения. Конкретные примеры будут гораздо более убедительны. Надеюсь, они появятся в следующей публикации по этой тематике.

(Статья рекомендована к печати по двум положительным рецензиям)

Код I г, II г, III г