

На правах рукописи

КОЖАНОВА ЛЮДМИЛА АЛЕКСЕЕВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ УЛУЧШЕНИЯ
АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ХРОМАТОГРАФОВ СЕРИИ
"МИЛИХРОМ"

02.00.02 - аналитическая химия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск 1996

Работа выполнена в Новосибирском институте
биоорганической химии
Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель: кандидат химических наук
Г.Г. Шамовский

Официальные оппоненты: доктор химических наук
В.Н. Сидельников

кандидат химических наук
О.В. Шуваева

Ведущая организация: Лимнологический институт
СО РАН, г. Иркутск

Защита состоится "29" января 1997 года в 10 часов
на заседании диссертационного совета Д 002.52.01 в
Институте неорганической химии СО РАН по адресу:
630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института неорганической химии СО РАН.

Автореферат разослан "15" декабря 1996 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук

Л.М. Буянова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Широкое применение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) объясняется тем, что этот метод позволяет в ряде случаев одновременно проводить разделение пробы на отдельные компоненты, идентификацию и количественное определение каждого из компонентов смеси. Воспроизводимость метода ВЭЖХ, уникальная разрешающая способность, экспрессность и простота превратили его в мощный инструмент химического анализа.

Поскольку ВЭЖХ является многоканальным источником информации, развитие современных методов математической обработки многоканальных данных открывает уникальные возможности в хроматографии, что, в свою очередь, требует исследования тех аналитических параметров хроматографического процесса, которые решающим образом влияют на воспроизводимость и достоверность исходных (необработанных) хроматографических данных и интерпретацию выходящей информации.

Для решения многих практических задач методом жидкостной хроматографии в режиме многоканального детектирования широкое распространение получили спектрофотометрические детекторы для ультрафиолетовой и видимой области спектра. Спектральная ширина щели монохроматоров таких детекторов может меняться в пределах 5-20 нм. Возможность их использования для идентификации индивидуальных веществ при хроматографии, в том числе при плохом разделении хроматографических пиков или при наличии градиента концентрации в кювете, требует изучения. Проблема влияния спектральной ширины щели монохроматора на погрешность измерения оптической плотности возникает также при сопоставлении спектральных данных, полученных на различных приборах, при прямом спектрофотометрическом анализе многокомпонентных смесей, при сравнении экспериментальных спектров с библиотечными.

С другой стороны, расширение круга задач, решаемых методом ВЭЖХ, включение в качестве изучаемых объектов все более сложных систем, а также ужесточение требований, предъявляемых к методам анализа, требует постоянного совершенствования приборов, приводящего к улучшению их аналитических характеристик.

Улучшение селективности разделения сложных смесей веществ при хроматографии в микромасштабе напрямую связано с созданием градиентного насоса, обеспечивающего минимальное искажение формируемого градиента концентраций элюентов. Аналогичные задачи минимального размывания преформированных зон возникают также и при использовании постколоночной дериватизации.

Другим перспективным направлением улучшения аналитических характеристик является использование флуориметрической детекции. Поскольку флуориметрические детекторы являются в настоящее время одними из наиболее чувствительных и селективных из применяемых в жидкостной хроматографии, задача создания простых, надежных и недорогих флуориметрических детекторов остается актуальной.

Цель работы. Одной из целей работы является изучение влияния спектральной ширины щели монохроматора спектрофотометрического детектора на спектры поглощения веществ и отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера. Это необходимо для повышения уровня достоверности при идентификации индивидуальных веществ и при оценке гомогенности хроматографических пиков. Другое конкретное направление работы - исследование возможности улучшения аналитических характеристик (чувствительности и селективности) хроматографов серии "Миличром" при использовании флуориметрического детектора и градиентного насоса с эффективным малообъемным смесителем.

Научная новизна. Впервые проведено моделирование совместного влияния спектральной ширины щели монохроматора и крутизны оптического тракта (суперпозиции спектра излучения монохроматора и чувствительности фотоприемника) в пределах щели на форму спектров поглощения веществ и отклонение от линейности калибровочных кривых. Во всех предшествующих работах влияние оптического тракта не учитывалось.

Предложен численный алгоритм расчета и компьютерная программа, позволившие впервые провести такие расчеты для произвольной формы спектра вещества, оптического тракта и спектральной щели.

Впервые проведен расчет влияния спектральной ширины щели на изменение абсорбционных отношений (отношение величины поглощения при одной длине волны к величине поглощения при другой) при

элюировании хроматографического пика чистого вещества с учетом неоднородного распределения вещества в кювете.

Показана возможность уменьшения предела обнаружения при хроматографическом анализе ряда веществ примерно в 50 раз при замене фотометрической детекции на флуориметрическую при минимальных конструктивных изменениях в хроматографе "Миличром-4".

Приведено обоснование и экспериментальное подтверждение минимальности искажения формируемого градиента концентраций элюентов при использовании в градиентном насосе оригинального малообъемного смесителя с каналом специфической формы (волновым каналом).

Практическая значимость. Проведенные расчеты влияния спектральной ширины щели и крутизны оптического тракта на спектры поглощения веществ и отклонения от закона Бера выявили источники искажений в спектре поглощения веществ и причины кажущейся неомогенности хроматографического пика заведомо чистого вещества. Проведенное исследование является базой для создания алгоритмов обработки данных, учитывающих рассмотренные эффекты и, таким образом, повышающих достоверность анализа.

Расширение аналитических возможностей хроматографов серии "Миличром" за счет флуориметрического детектора и градиентного насоса позволяет понизить пределы обнаружения и повысить селективность хроматографических методов определения ряда веществ, в частности полициклических ароматических углеводородов.

На защиту выносятся:

-алгоритм и результаты расчетов совместного влияния спектральной ширины щели монохроматора и крутизны оптического тракта спектрофотометрического детектора на спектры поглощения веществ и отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера при однородном распределении вещества в кювете, а также вытекающие из результатов расчетов выводы;

-расчет влияния спектральной ширины щели на изменение абсорбционных отношений при элюировании хроматографического пика чистого вещества при наличии градиента концентрации вещества в кювете;

-увеличение чувствительности хроматографа "Миличром-4" примерно в 50 раз за счет нового флуориметрического детектора;

-способ уменьшения продольного размывания зоны вещества в реакторах-смесителях для градиентной хроматографии и постколоночной дериватизации, обеспечивающий минимальное искажение задаваемой формы градиента за счет использования малообъемного смесителя с оригинальным волновым каналом.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на VI Всероссийском симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии (г. Москва, 1993г.).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 3 статьи.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы, включающего 60 наименований работ советских и зарубежных авторов. Объем работы - 135 страниц основного текста, в том числе 39 рисунков и 4 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Во введении обоснована актуальность темы и рассмотрены цели, научная новизна и практическая значимость работы.

В главе 1 проанализированы опубликованные к настоящему времени литературные данные по способам оценки гомогенности и чистоты хроматографических пиков. Рассмотрены причины кажущейся негомогенности хроматографических пиков, связанные с недостаточной монохроматичностью падающего света, с неоднородным распределением вещества в кювете. Представлены данные по способам уменьшения продольного размывания зоны вещества в реакторах-смесителях для градиентной хроматографии и постколоночной дериватизации, по флуориметрическим хроматографическим детекторам.

В главе 2 рассмотрено влияние спектральной ширины щели монохроматора и крутизны оптического тракта спектрофотометрического детектора на форму спектров поглощения веществ и отклонение от линейности калибровочных кривых.

В литературном обзоре было показано, что причиной плохого совпадения некоторых рассчитанных и экспериментальных результатов является неучтенная зависимость регистрируемой интенсивности падающего света (оптического тракта) от длины волны. Поскольку вид оптического тракта индивидуален для каждого конкретного детектора даже в пределах одной серии (на рис. 1 показаны оптические тракты

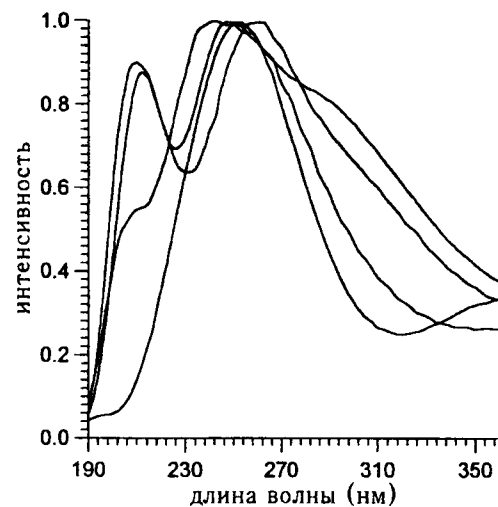


Рис. 1. Оптические тракты четырех детекторов хроматографа "Милихром-4".

щели и формы оптического тракта на абсорбционный спектр вещества для приоров с линейной дисперсией.

Оптическая плотность $A(\lambda_0)$ в каждой точке спектра поглощения вещества λ_0 в выбранном спектральном диапазоне рассчитывалась методом численного интегрирования по следующей формуле:

$$A(\lambda_0) = \lg \frac{\int_{\lambda_0-\delta/2}^{\lambda_0+\delta/2} I(\lambda) h(\lambda-\lambda_0) d\lambda}{\int_{\lambda_0-\delta/2}^{\lambda_0+\delta/2} I(\lambda) h(\lambda-\lambda_0) 10^{-\epsilon(\lambda)c l} d\lambda} \quad (1)$$

где:

$A(\lambda_0)$ - рассчитанная оптическая плотность для каждой (из примерно 100) точек абсорбционного спектра вещества в выбранном спектральном диапазоне;

для четырех детекторов хроматографа "Милихром-4"), важно иметь представление о том, в каких случаях необходимо учитывать эти различия.

Моделирование искажений спектров, вызываемых реальными спектрофотометрами, проводилось с помощью специально разработанной по нашему алгоритму компьютерной программы, которая позволяет рассчитать влияние спектральной ширины

λ_0 - центральная длина волны интервала интегрирования для каждой точки спектра вещества, нм;

δ - спектральная ширина щели, нм;

λ - текущая длина волны, нм;

$h(\lambda-\lambda_0)$ - функция, описывающая форму спектральной щели монохроматора, определяется конструкцией входной и выходной щелей монохроматора;

$I(\lambda)$ - комбинированная функция, описывающая оптический тракт (зависимость регистрируемой интенсивности падающего света от длины волны), и являющаяся суперпозицией интенсивности источника света, потерь света на оптических элементах и спектральной чувствительности фотоприемника;

$\epsilon(\lambda)$ - коэффициент экстинкции вещества, полученный на спектрофотометре с узкой щелью (около 0.1 нм). Абсорбционный спектр с этими значениями коэффициентов экстинкции рассматривается как истинный;

c - концентрация вещества, измеренная в единицах, согласованных с коэффициентом экстинкции;

l - длина оптического пути в сантиметрах.

Исходные функции $h(\lambda-\lambda_0)$, $I(\lambda)$, $\epsilon(\lambda)$, необходимые для расчета оптической плотности по программе, могут быть заданы двумя способами: с помощью кусочно-линейных приближений с любой необходимой дискретностью (этот способ позволяет описать практически все обычно встречающиеся формы щели, спектра вещества и оптического тракта); а также в виде функций Гаусса, что позволяет быстро и просто варьировать различные параметры и предпочтительнее при модельных расчетах.

Для качественной оценки совместного влияния спектральной ширины щели монохроматора и крутизны оптического тракта проведен расчет для следующей модельной системы: истинный спектр вещества - функция Гаусса с максимумом при 375 нм и шириной на полувысоте 20 нм; спектральная щель имеет форму равнобедренного треугольника с шириной на полувысоте 10 нм; оптические тракты трех разных типов. На рис. 2 представлен исходный спектр (кривая **a**) и просканиро-

ванные щелью спектры (кривые **b**, **c** и **d**) при оптических трактах, показанных кривыми **b'**, **c'** и **d'**, соответственно.

В полном соответствии с многочисленными литературными данными при нулевой крутизне оптического тракта (кривая **c'**) влияние щели проявляется в "сглаживании" - уменьшении интенсивности поглощения в центральной части и повышении интенсивности поглощения на склонах спектра с сохранением симметрии и положения максимума (кривая **c**).

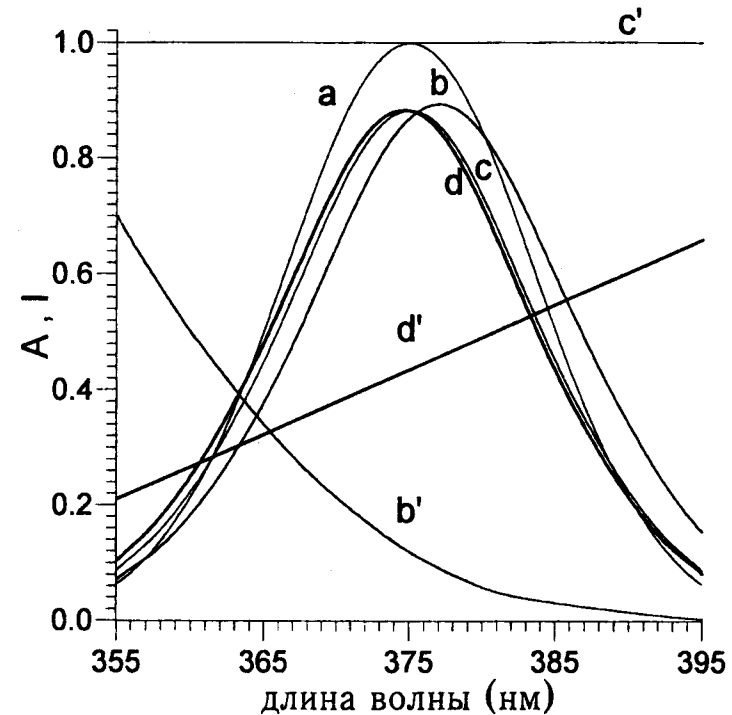


Рис. 2. Модельные исходный и расчетные спектры поглощения (A) и соответствующие им оптические тракты (I).

a - исходный спектр, **b**, **c**, **d** - расчетные спектры, **b'**, **c'**, **d'** - соответствующие им оптические тракты.

Спектр **d** соответствует линейно возрастающему тракту **d'**. Видно, что при таком тракте наряду со сглаживанием спектра появляется

асимметрия и смещение максимума в сторону меньших интенсивностей пропускания оптического тракта. Поскольку крутизна тракта d' мала, величина эффектов невелика.

Спектр b соответствует тракту b' с нелинейно уменьшающейся интенсивностью. Поскольку относительная крутизна этого тракта больше, чем у тракта d' , смещение максимума спектра b в направлении уменьшения интенсивности света в тракте и его асимметрия значительно больше, чем у спектра d .

Смещение спектра в направлении уменьшения интенсивности света в тракте фактически отражает увеличение относительного вклада в поглощение той части спектра вещества, которой соответствует большее количество света в тракте в пределах щели.

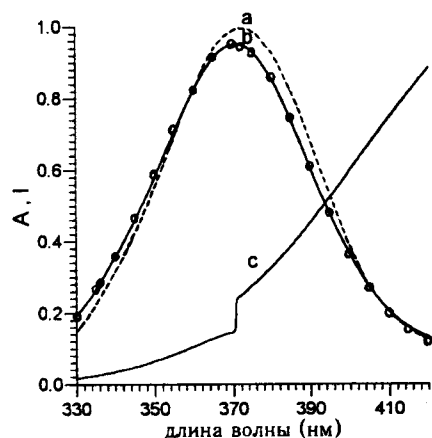


Рис. 3. Литературный, расчетный и экспериментальный спектры щелочного хромата калия.

a - литературный, b - расчетный, кружки - экспериментальный спектр, c - оптический тракт спектрофотометра Spekol 20.

Эти представления подтверждают экспериментальные данные, приведенные на рис. 3, где показаны истинный, расчетный и экспериментальный спектры поглощения хромата калия, а также оптический тракт спектрофотометра "Spekol 20". Расчетный и экспериментальный спектры хромата калия, полученные для спектральной ширины щели 15 нм, значительно сдвинуты в сторону меньших значений интенсивности света по тракту, причем этот сдвиг сопоставим по величине с эффектом сглаживания за счет щели. Наблюдается практически полное совпадения расчета и эксперимента.

Результаты количественного расчета описанных выше эффектов получены для трех длин волн симметричного спектра вещества гауссовой формы (кривая a на рис. 2), выбранных по принципу наибольших различий в характере спектра: для спектрального максимума (375 нм)

и двух длин волн на склонах спектра вблизи точки перегиба (365, 385 нм). Оптические тракты моделировались прямыми линиями с пропорционально меняющимися наклонами. Один из трактов показан на рис. 2, кривая d' . Обобщение результатов количественного расчета позволяет сделать следующие заключения:

а) влияние ширины щели как таковой сильнее проявляется в максимуме спектра, чем на его склонах вблизи точки перегиба, в то время, как влияние крутизны оптического тракта в максимуме практически отсутствует;

б) вклад, вносимый в сглаживание спектра щелью, является основным для узких полос в спектре поглощения вещества (отношение ширины спектра к ширине щели < 2), в то время, как для широкополосных спектров он становится сравнимым с влиянием крутизны оптического тракта;

в) влияние крутизны оптического тракта приводит к несимметричным сдвигам в спектре поглощения вещества. Это влияние проявляется в виде перекашивания спектра в сторону меньших значений интенсивности света по тракту.

г) характер отклонения от закона Бера калибровочных кривых анализируемых веществ практически одинаков при любой форме оптического тракта и определяется только шириной щели монохроматора;

д) разница для крутых и пологих оптических трактов проявляется в виде изменения наклонов калибровочных кривых анализируемых веществ в зависимости от индивидуальной формы каждого оптического тракта и собственной крутизны спектра в каждой точке.

Применение в хроматографии. При хроматографии во многих случаях первостепенным является вопрос о гомогенности (однородности) хроматографического пика. Отклонения от закона Бера, связанные с широкой спектральной щелью детектора, могут приводить к тому, что действительно гомогенный пик не отвечает требованию постоянства спектральных характеристик, например, абсорбционных отношений, R , по пику (отношение величины поглощения при одной длине волны к величине поглощения при другой).

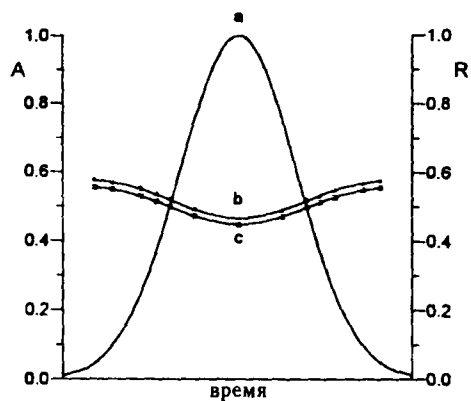


Рис. 4. Модельные абсорбционные отношения для гипотетического хроматографического пика чистого вещества. Спектр чистого вещества показан кривой d на рис. 2.

a-гипотетический хроматографический пик, b-абсорбционные отношения $A(365 \text{ нм})/A(375 \text{ нм})$, c- $A(385 \text{ нм})/A(375 \text{ нм})$.

данные, подтверждающие подобный характер абсорбционных отношений при элюировании хроматографического пика антрацена. Для антрацена приводятся также результаты модельного расчета и эксперимента, показывающие, как с помощью правильного выбора длин волн для регистрации абсорбционных отношений можно значительно сгладить эффекты, приводящие к кажущейся негомогенности хроматографического пика чистого вещества.

В главе 3 рассмотрены причины кажущейся негомогенности хроматографического пика чистого вещества, связанные с градиентом концентрации вещества в кювете. Приведенные в литературном обзоре данные свидетельствуют о том, что в типичных хроматографических кюветах с "Z"-образными подводами не наблюдается полного перемешивания пробы. К настоящему времени нет каких-либо значительных исследований по учету совместного влияния недостаточной монохроматичности света и градиента концентрации вещества в кювете при элюировании хроматографического пика. Поэтому для выяснения характера такого влияния мы ограничились рассмотрением простой модели заданного градиента концентрации, воспроизведенного затем в

Это иллюстрирует рис. 4, где показан гипотетический гомогенный хроматографический пик и два абсорбционных отношения по пику, рассчитанные для спектра d на рис. 2. Видно, что в случае нарушения закона Бера появляются симметричные искажения абсорбционных отношений при элюировании хроматографического пика чистого вещества с появлением экстремума.

В диссертации представлены расчетные и экспериментальные дан-

кювете "Милихрома-4" с прямыми подводами. Рассматривалась гипотеза о том, что в кювете не происходит размывания зоны пробы и градиент концентрации элюируемого вещества практически повторяет распределение вещества в части хроматографического пика, заключенной в данный момент в кювете. В качестве модельного спектра была выбрана длинноволновая полоса в спектре поглощения уридина, которая для упрощения расчетов представлялась гауссовой функцией. Расчет оптической плотности проводили по формуле (1) с учетом меняющейся концентрации.

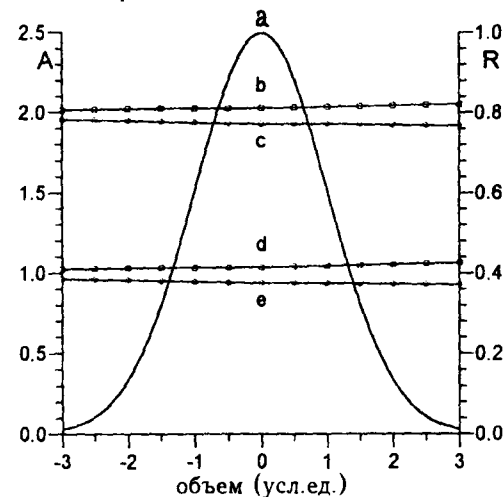


Рис. 5. Модельные абсорбционные отношения в присутствии градиента концентрации в кювете. a-модельный хроматографический пик уридина; b- $A(270 \text{ нм})/A(260 \text{ нм})$; c- $A(250 \text{ нм})/A(260 \text{ нм})$; d- $A(280 \text{ нм})/A(260 \text{ нм})$; e- $A(240 \text{ нм})/A(260 \text{ нм})$

Результаты расчета представлены на рис. 5. Кривой a показан хроматографический пик уридина, зарегистрированный при 260 нм (максимум спектра), остальные кривые представляют изменение абсорбционных отношений при элюировании пика для длин волн на разных склонах спектра уридина. Рисунок наглядно демонстрирует, что наличие градиента концентрации вещества в кювете приводит к несимметричным изменениям абсорбционных отношений по профилю элюируемого пика заведомо чистого вещества. Причем эти изменения различаются знаком наклона для разных склонов спектра.

В диссертации показано качественное совпадение результатов расчета и эксперимента при прокачивании через кювету зоны уридина в прямом и обратном направлении в режиме псевдохроматографии.

Проведенное исследование демонстрирует сложную взаимосвязь факторов, приводящих к нестабильности абсорбционных отношений при элюировании пика чистого вещества, которая может иметь место

на практике. Если отклонения от линейности за счет недостаточной монохроматичности света при однородном распределении вещества в кювете приводят к симметричному искажению абсорбционных отношений по пику с появлением экстремума (рис. 4), то наличие градиентов концентрации вещества вдоль направления развертки по длинам волн могут приводить к несимметричным искажениям (рис. 5). При этом очевидно, что с изменением функции распределения концентрации вещества в кювете характер абсорбционных отношений может значительно отличаться от показанного в этой работе. Эффекты подобного рода тем больше, чем больше градиент концентрации, спектральная ширина щели, собственная крутизна спектра поглощения при данной длине волны. Для узких хроматографических пиков, выходящих на высокоэффективных колонках в начале хроматограммы, эти эффекты более значимы, чем для пиков с большими временами удерживания, которые при подходе к кювете имеют более пологий градиент концентрации, что иллюстрирует рис. 6 - хроматограмма смеси полициклических ароматических углеводородов.

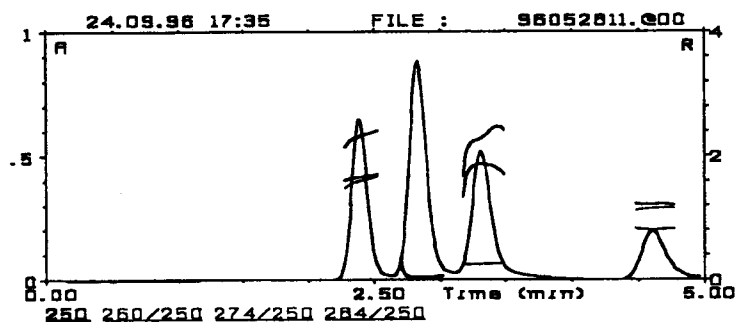


Рис. 6. Хроматограмма смеси полициклических ароматических углеводородов (по времени выхода - нафталин, антрацен, пирен, бенз(а)пирен).

Проведенное исследование позволило понять причины наблюдаемой на реальных хроматограммах нестабильности абсорбционных отношений при элюировании хроматографических пиков чистых веществ, связанные с влиянием широкой спектральной щели монохроматора и градиента концентрации в кювете, что создает предпосылки для учета рассмотренных эффектов в алгоритмах обработки данных и повышения достоверности анализа.

В главе 4 рассмотрен новый эффективный пассивный смеситель - основной элемент градиентного насоса, обеспечивающий минимальное искажение задаваемой формы градиента и минимальное размывание преформированных зон.

Как известно, стационарный ламинарный поток в цилиндрических трубах характеризуется параболическим профилем скоростей, разница в скоростях от стенок трубы до ее центра вызывает значительное размывание зоны вещества, инжектированного в поток носителя, при прохождении его по трубе. Если, однако, параболический профиль скоростей удастся нарушить подходящим способом, например, геометрической деформацией канала, размывание зоны в трубе может быть значительно уменьшено.

В литературном обзоре были показаны преимущества впечатанных и выгравированных в прозрачных твердых пластинах каналов в реакторах-смесителях, увеличивающих эффективность радиального перемешивания при одновременном уменьшении аксиального размывания задаваемого профиля. Предлагаемый нами волновой реактор в полной мере отвечает предъявляемым требованиям.

Волновой реактор представляет собой монолит, изготовленный из двух стеклянных пластин с вытравленными в них методом планарной технологии каналами и спеченных между собой. Канал каждой пластины волнового реактора состоит из последовательности полусфер диаметром 0.3 мм. Топология канала задана таким образом, чтобы при спекании пластин последовательности полусфер оказались смещенными друг относительно друга на величину радиуса, рис. 7.

Размывание в волновом канале сравнивалось с размыванием в "идеальном" капилляре - капилляре из фторопласта с гладкими стенками длиной 10 м, с таким же, как у волнового реактора, сечением.

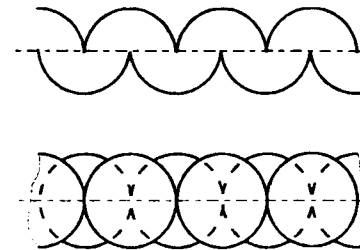


Рис. 7. Профиль волнового канала. Вид сбоку и сверху.

Размывание зоны краски при прохождении ее по участку реактора оценивалось в терминах длины смешивания, которую можно описать в терминах высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), в сантиметрах, по формуле:

Размывание зоны краски при прохождении ее по участку реактора оценивалось в терминах длины смешивания, которую можно описать в терминах высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), в сантиметрах, по формуле:

$$H = W^2 / (5.54 * S * V * 10), \text{ где:}$$

H - ВЭТТ, см; W - ширина пика на полувысоте, мкл;
S - площадь эффективного поперечного сечения, мм²;
V - объем реактора (участка реактора), мкл.

На рис. 8 показана зависимость H от линейной скорости потока (U) для волнового реактора, а также для "идеального" капилляра с близкими значениями внутреннего диаметра каналов. Для "идеального" капилляра с увеличением скорости потока наблюдается существенный рост размывания зоны краски, согласующийся с теоретическими предпосылками, тогда, как величина H для волнового реактора достигает величин, характерных для турбулентной области, уже при низких линейных скоростях потока.

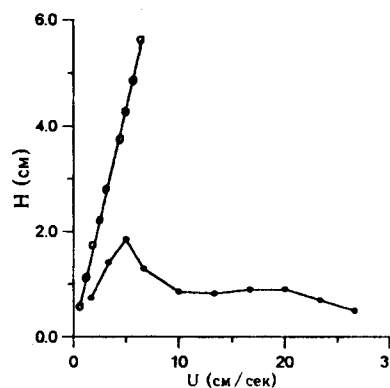


Рис. 8. Сравнение размывания волнового канала и "идеального" капилляра. Незакрашенные кружки - "идеальный" капилляр, закрашенные кружки - волновой канал.

В таблице 1 приведено сравнение литературных данных по ВЭТТ для трубок различной геометрии, полученных в сопоставимых экспериментальных условиях (водные растворы, U=27 см/сек., близкие радиусы r), с результатами для нашего волнового реактора.

Таблица 1. Сравнение данных по ВЭТТ.

Геометрия канала	r, мм	H, см
Идеальный прямой капилляр	0.125	15.6
Медная прямая трубка с шероховатыми стенками	0.125	16.9
Медная трубка, свитая в спираль	0.125	6.0
Фторопластовый зигзагообразный капилляр	0.125	3.3
То же	0.375	3.8
Стальной капилляр с овальным сечением, закрученный винтом и свитый в спираль	0.5	2.1
Трехмерный вязаный капилляр	0.375	0.8
Исследуемый волновой стеклянный реактор	0.126	0.5

Проведенные исследования дали возможность создать градиентный насос, предназначенный для формирования градиентов концентраций бинарных элюентов при микроколоночной жидкостной хроматографии с использованием детектора с малообъемной проточной кюветой, оригинальным элементом конструкции которого является пассивный смеситель, обеспечивающий эффективное перемешивание жидкостей при минимальном искажении формируемого градиента.

В главе 5 приведены результаты исследования аналитических возможностей нового флуориметрического детектора хроматографа "Милихром", разработанного совместно с КТИПМ СО РАН.

Флуориметрический детектор предназначен для работы в составе микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром-4" и значительно расширяет области применения прибора. Он позволяет регистрировать интегральную интенсивность флуоресценции на любой фиксированной длине волны возбуждения в диапазоне 190-360 нм. В качестве источника света возможно использование дейтериевой лампы ДДС-30 (штатный источник света хроматографа "Милихром"), что дает возможность реализовать режим одновременной многоволновой регистрации, как при фотометрической детекции. Использование ртутной лампы ДРГС-12 позволяет увеличить чувствительность при длине волны возбуждения 254 нм в 5 - 7 раз.

Для демонстрации возможностей флуориметрического детектора и сравнения его с фотометрическим детектором были выбраны соединения класса полициклических ароматических углеводородов антрацен и бенз(а)пирен, часто анализируемые флуориметрическим методом. Пределы обнаружения, определенные как концентрация вещества в пробе, при которой амплитуда сигнала втрое превышает уровень шума, составили: для антрацена - 0.5 нг/мл, для бенз(а)пирена - 2 нг/мл при объеме пробы 10 мкл. Пределы обнаружения, достигнутые при флуориметрической детекции, примерно в 50 раз ниже, чем при фотометрической детекции. В диссертации приведены типичные калибровочные графики и данные по воспроизводимости определения антрацена и бенз(а)пирена.

На рис. 9 представлены спектры возбуждения раствора бенз(а)пирена в ацетонитриле, снятые на описываемом детекторе с дейтериевой лампой в качестве источника возбуждения и на флуориметре MPF-4, "Hitachi", Япония.

Качественно спектры сходны, расхождения объясняются в основном существенным различием ширины щели возбуждающего излучения и эффектами, связанными с зависимостью интенсивности возбуждающего света от длины волны, обусловленной особенностями оптического тракта "Милихрома". В диссертации проанализированы основные факторы, ответственные за неидентичность оптических трактов приборов одной серии. Спектры флуоресценции, полученные с помощью нового детектора, могут быть использованы для идентификации веществ при наличии соответствующих стандартов.

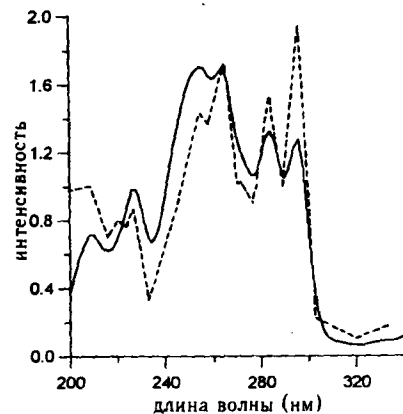


Рис.9. Спектры возбуждения бенз(а)пирена, снятые на двух спектрофлуориметрах: на "Милихроме" (сплошная линия) и на МРФ-4, "Hitachi", Япония (прерывистая линия).

ВЫВОДЫ.

1. Разработан алгоритм, впервые позволивший провести расчет совместного влияния спектральной ширины щели монохроматора и крутизны оптического тракта на форму спектров поглощения веществ и отклонение от линейности калибровочных кривых. Задача расчета влияния ширины щели и оптического тракта решена полностью для произвольной формы спектров вещества, оптического тракта и спектральной щели для случая равномерного распределения вещества в кювете.

2. Показано, что для узких полос в спектре поглощения вещества (отношение ширины спектра к ширине щели < 2) основной вклад в искажение формы спектра вносит ширина щели как таковая. Для широкополосных спектров вклад, вносимый крутизной оптического тракта, становится сравнимым с влиянием ширины щели. Влияние оптического тракта приводит к несимметричным сдвигам в спектрах поглощения веществ.

3. Показано, что отклонение калибровочных кривых анализируемых веществ от линейности определяется в основном шириной щели монохроматора, в то время, как их наклон значительно зависит также и от индивидуальной формы каждого оптического тракта.

4. Установлено, что при элюировании хроматографического пика чистого вещества характерными проявлениями влияния недостаточной монохроматичности света являются симметричные искажения абсорбционных отношений с появлением экстремума в максимуме хроматографического пика за счет отклонений от линейности и несимметричные искажения - при совместном влиянии широкой спектральной щели и градиента концентрации вещества в кювете.

5. Исследованы возможности нового флуориметрического детектора хроматографа "Милихром" и на примере количественного хроматографического определения антрацена и бенз(а)пирена показано уменьшение предела обнаружения примерно в 50 раз при замене фотометрической детекции на флуориметрическую. На основании анализа погрешностей при измерении флуоресценции намечены пути дальнейшего совершенствования нового детектора.

6. Исследован новый малообъемный реактор-смеситель с волновым каналом для градиентной хроматографии и постколоночной дериватизации, обеспечивающий минимальное искажение задаваемой формы градиента и минимальное размывание преформированных зон. Показаны преимущества волнового канала по сравнению с каналами другой геометрии.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Л.А.Кожанова, Г.Г.Шамовский. Влияние ширины щели монохроматора спектрофотометрического детектора на параметры спектра поглощающих веществ. //Журн. физич. химии. -1994. -Т.68. -N10. -С.1839-1865.
2. Ю.А.Болванов, Л.А.Кожанова, С.В.Кузьмин, Г.Г.Шамовский. Флуориметрический детектор хроматографа "Милихром-4MF". //Журн. физич. химии. -1994. -Т.68. -N10. -С.1866-1867.
3. Ю.А.Болванов, С.В.Власов, А.В.Гельфанд, Л.А.Кожанова, Г.Г.Шамовский. Градиентный насос для микроколоночной жидкостной хроматографии. //Журн. физич. химии. -1994. -Т.68. -N10. - С.1857-1863.

Мили