

Российская академия наук
Сибирское отделение
НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

на правах рукописи

КОЖАНОВА
Людмила Алексеевна

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ УЛУЧШЕНИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ
ХАРАКТЕРИСТИК ХРОМАТОГРАФОВ СЕРИИ "МИЛИХРОМ"

02.00.02 - аналитическая химия

диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук



Научный руководитель
кандидат химических наук
Г.Г. Шамовский

Новосибирск - 1997

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	9
1.1. Способы оценки гомогенности и чистоты хроматографических пиков.....	9
1.2. Причины кажущейся негомогенности хроматографического пика, связанные с широкой спектральной щелью детектора.....	19
1.3. Причины кажущейся негомогенности пика, связанные с неоднородным распределением вещества в кювете.....	25
1.4. Способы уменьшения продольного размывания зоны вещества в реакторах-смесителях для градиентной хроматографии и постколоночной дериватизации.....	29
1.5. Флуориметрические хроматографические детекторы.....	36
1.6. История микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром".....	44
ГЛАВА 2. ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОЙ ШИРИНЫ ЩЕЛИ МОНОХРОМАТОРА НА ФОРМУ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ВЕЩЕСТВ.....	46
2.1. Теория.....	48
2.2. Экспериментальная часть.....	50
2.3. Качественное описание.....	51
2.4. Количественный анализ.....	55
2.5. Применение в хроматографии.....	66
ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОЙ ШИРИНЫ ЩЕЛИ И ГРАДИЕНТА КОНЦЕНТРАЦИИ В КЮВЕТЕ НА ОЦЕНКУ ГОМОГЕННОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПИКА.....	78
ГЛАВА 4. ОРИГИНАЛЬНЫЙ ВОЛНОВОЙ СМЕСИТЕЛЬ ДЛЯ ГРАДИЕНТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ПОСТКОЛОНОЧНОЙ ДЕРИВАТИЗАЦИИ.....	97
4.1. Экспериментальная часть.....	97

4.2. Результаты и обсуждение.....	102
4.3. Градиентный насос для микроколоночной жидкостной хроматографии.....	108
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ НОВОГО ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ДЕТЕКТОРА ХРОМАТОГРАФА "МИЛИХРОМ-4".....	116
ВЫВОДЫ.....	127
ЛИТЕРАТУРА.....	129

ВВЕДЕНИЕ.

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 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 задаваемого градиента. 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 "Милихром" 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 (суммарного спектра излучения монохроматора и чувствительности фотоприемника) в пределах щели на форму спектра поглощения веществ и отклонение от линейности калибровочных кривых. Во всех предшествующих работах влияние оптического тракта не учитывалось.

Предложен алгоритм расчета и компьютерная программа, позволяющие 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 "Милихром-4".

Приведено обоснование и экспериментальное подтверждение минимальности искажения формируемого градиента 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 неогомогенности 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 "Милихром" за счет флуориметрического детектора и градиентного насоса позволяет понизить пределы обнаружения и повысить селективность хроматографических методов определения ряда веществ, в частности полиароматических углеводов.

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 в кювете;

-увеличение чувствительности хроматографа "Милихром-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 задаваемого 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.

ГЛАВА 1.
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.

В соответствии с заявленной целью работы в литературном обзоре будет рассмотрено современное состояние проблем по следующим направлениям хроматографического анализа:

1.1. Способы оценки гомогенности и чистоты хроматографических пиков;

1.2. Причины кажущейся негомогенности хроматографического пика, связанные с широкой спектральной щелью детектора;

1.3. Причины кажущейся негомогенности пика, связанные с неоднородным распределением вещества в кювете;

1.4. Способы уменьшения продольного размывания зоны вещества в реакторах-смесителях для градиентной хроматографии и пост-колоночной дериватизации;

1.5. Флуориметрические хроматографические детекторы.

1.6. История микроколоночного жидкостного хроматографа "Милхром".

1.1. СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ГОМОГЕННОСТИ И ЧИСТОТЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПИКОВ.

Одно из ключевых требований, предъявляемых к хроматографическим методам - высокая селективность разделения веществ, непосредственно связанная с понятиями чистоты и гомогенности хроматографических пиков. С появлением быстро сканирующих детекторов и детекторов с диодной матрицей в ВЭЖХ возникла реальная возможность получения большого массива данных в режиме многока-

нальной детекции. Это, в свою очередь, дает богатый материал для разработки чувствительных, надежных и простых методов оценки как гомогенности, так и чистоты хроматографических пиков.

Рассмотрим понятия гомогенности и чистоты пика. Гомогенный хроматографический пик должен иметь идентичные спектральные характеристики по всему пику. Такой пик вероятнее всего состоит из одного вещества, хотя не исключена вероятность присутствия второго вещества с идентичными первому временем удерживания и уширением пика. Для того, чтобы идентифицировать такой пик как "чистый", необходимо сравнить спектральные характеристики этого пика с референтным образцом. Следовательно, гомогенный пик может оказаться "нечистым" в том случае, когда два вещества с разными спектрами совершенно не различаются по хроматографическому поведению.

В данном обзоре будут рассмотрены как методы оценки чистоты пика, так и его гомогенности, применимые к быстросканирующим детекторам и детекторам с диодной матрицей, основанные на регистрации оптической плотности при нескольких длинах волн при элюировании хроматографического пика, с последующей математической обработкой полученных данных с использованием методологии абсорбционных отношений. Методы, связанные с разложением перекрывающихся пиков на исходные компоненты с последующей их количественной оценкой (основанные на методологии факторного анализа) и требующие гораздо более мощного математического аппарата, в данном обзоре не рассматриваются. Эти методы подробно рассмотрены в обзоре Брауна с сотрудниками [1].

Принципы многих алгоритмов оценки чистоты пиков были обоснованы задолго до того, как быстросканирующие спектрофотометры и

детекторы с диодной матрицей стали коммерчески доступными. Использование абсорбционных отношений (отношение величины поглощения при одной длине волны к величине поглощения при другой) для характеристики хроматографических пиков до сих пор остается одним из наиболее популярных способов благодаря простоте понимания и реализации. Детальный теоретический анализ применения абсорбционных отношений (AR, absorbance ratio) для идентификации и разрешения перекрывающихся хроматографических пиков дал Остожик [2]. Он показал, что для любого элюируемого чистого вещества отношение поглощений, детектируемых при двух разных длинах волн, должно оставаться постоянным по ходу всего профиля элюции при условии соблюдения закона Бугера-Ламберта-Бера и незначительного экспериментального шума. Константа, соответствующая абсорбционному отношению для специфической пары длин волн, является характеристикой вещества при его идентификации.

Практическое применение метода AR разработано Иостом с сотрудниками [3]. Он выделил две основные стратегии для определения присутствия примеси, элюирующейся вместе с основным веществом. При доступности спектральных данных для чистого вещества сравнение референтного спектра со спектральными данными для хроматографического пика позволяет оценить чистоту этого пика. Когда такие референтные спектры недоступны, возможна регистрация спектра в различных точках хроматографического пика для оценки его гомогенности или гетерогенности.

Байлина с сотрудниками [4] были первыми, кто предложил идею постоянного мониторинга AR при элюировании хроматографического пика. Для гомогенного пика графическое изображение профиля AR должно теоретически соответствовать прямоугольному сигналу (AR

равно нулю, когда пик отсутствует, и равно постоянному значению, начиная с какого-то заданного уровня детекции, по ходу элюирования пика). Любое отклонение от этой формы указывает на присутствие примеси.

С развитием детекторов с диодной матрицей различные авторы критически переосмыслили использование AR - профилей [5,6]. Было показано, что вариации в отсечении базовой линии вызывают отклонения профиля AR от прямоугольного для гомогенного пика. В дополнение в последней работе отмечено значительное влияние перекрывания соседних пиков на форму профилей AR для этих пиков.

Были также продолжены исследования по оптимизации выбора длин волн для расчета AR. Уайт [7,8] показал, что по крайней мере два AR необходимо для индивидуальной характеристики серии барбитуратов. До семи AR, рассчитанных для длин волн во всем диапазоне поглощения интересующих веществ, было использовано для определения окрашенных компонентов в судебно-медицинских анализах [9]. В случаях, когда спектральные характеристики обоих совместно элюирующихся веществ известны, оптимальные пары AR легко находят расчетом отношений в индивидуальных спектрах: определяют максимальные и минимальные отношения, которые соответствуют комбинации длин волн, обеспечивающих максимальную чувствительность по спектральному разрешению [5]. Используя такие оптимальные пары длин волн, можно определить до 1% примеси носкапина в папаверине.

Шараф с сотрудниками [10] рассмотрели проблему выбора оптимальных AR с точки зрения максимальной статистической достоверности получаемых результатов. Они исследовали влияние случайного шума и выбора длины волны на надежность расчета AR и предложили

теоретическую модель оценки относительного стандартного отклонения, S_{AR}/AR , в AR измерениях. Было показано, что S_{AR}/AR зависит от двух параметров. Чем больше отношение сигнал/шум (SNR_1 , signal-to-noise ratio) тем лучше оценка AR, т.е. концентрация вещества должна быть максимально большой в пределах линейного диапазона калибровки. Вторым параметром, определяющим ошибку в AR, - это так называемая относительная чувствительность, m , (при одинаковом шуме на двух длинах волн она равна самой величине AR). Для увеличения достоверности в оценке AR эта величина должна быть как можно меньше. Относительная чувствительность определяется подходящим выбором длин волн с учетом спектральных характеристик вещества.

$$S_{AR}/AR = [1/(SNR_1)](1+m^2)^{1/2}, \text{ здесь } AR = A_1/A_2,$$

A_1, A_2 - оптические плотности на двух длинах волн.

Таким образом, правильным выбором длин волн и диапазона концентраций ошибка в AR измерениях может быть доведена до минимально возможного уровня.

Для увеличения чувствительности определения наличия примеси в основном веществе Картер с сотрудниками [11] и Фэлл с сотрудниками [5] предложили использовать метод спектрального подавления. Принцип метода заключается в регистрации по ходу хроматограммы не оптических плотностей на двух длинах волн, A_1 и A_2 , а функции вида $y = A_1 - AR \cdot A_2$, где $AR = A_1/A_2$. Тогда для чистого вещества профиль сигнала, соответствующего данной функции, не должен отличаться от нуля, а любые отклонения в положительную или отрицательную сторону свидетельствуют о присутствии примеси.

Такой прием при значительных спектральных различиях веществ, например, акридона и карбамазепина [11], позволяет определить до 0.1% примеси, элюирующейся совместно с основным веществом.

В то время, как одни исследователи предпринимают усилия по подбору подходящих пар AR для случаев, когда спектральные характеристики потенциально совместно элюирующихся веществ неизвестны, другие создают и исследуют новые алгоритмы, включающие использование спектральной информации для трех и более длин волн.

Пойл и Конлон [12] предложили алгоритм, получивший название "абсорбционный индекс", основанный на расчете частного от деления двух спектров для набора длин волн в точках перегиба в лидирующей и хвостовой частях хроматографического пика. Теоретически для гомогенного пика график зависимости такого частного от длины волны должен отображаться прямой линией, параллельной оси длин волн. Отклонения от горизонтальной прямой указывают на спектральные различия в хроматографическом пике и предполагают присутствие примеси. Для усиления этого алгоритма Пойл и Конлон предложили также использовать дискриминатор, D, - число, характеризующее отношение максимального частного к минимальному. Для гомогенного пика дискриминатор должен быть равен единице. Однако на практике, с учетом шума, величина D между 1 и 1.5 является пределом спектральных различий при отношении сигнал/шум больше, чем 10:1.

Параметр чистоты (PUP, purity parameter) детально описали Алфредсон и Шихан [13]. Он определяется как абсорбционно-взвешенная длина волны спектра при определенном времени элюции и аналогичен статистическому расчету момента распределения по длинам волн в интервале от λ_0 до λ_n , нм:

$$PUP(A) = \sum A_i^2 \lambda_i / \sum A_i^2 ,$$

суммирование происходит по i от 0 до n .

На практике расчет производится в ограниченном диапазоне длин волн. Как и AR, PUP для каждого спектра зависит от выбора длин волн и является характеристикой индивидуального вещества, поэтому он может использоваться для подтверждения как гомогенности, так и чистоты пика.

Сравнение использования AR и PUP индексов для оценки спектральных различий веществ в жидкостной хроматографии провел Уайт [14]. Он показал, что оба метода дают примерно одинаковые результаты и позволяют детектировать 1% примеси в основном веществе (метопропол в смесях с атенолом). Оба метода просты и достаточно чувствительны, но только при условии оптимизации по длинам волн для получения максимального спектрального разрешения, что ограничивает их всеобщее применение.

Март с сотрудниками [15] предложили новый метод, основанный на комбинации абсорбционных отношений - множественная корреляция абсорбционных отношений (MARC, multiple absorbance ratio correlation). Алгоритм рассчитывает коэффициент корреляции между внутренним (в максимуме хроматографического пика) - для оценки гомогенности, или внешним (например, библиотечным) - для оценки чистоты, референтным пятиточечным вектором абсорбционных отношений и похожим вектором, полученным для последовательных временных интервалов по ходу хроматографического пика. Для образца, когда бинарный пик выглядел гомогенным, предел детекции примеси параксантина в теофилине в 1% был получен методом MARC, в то

время, как стандартный метод AR в тех же условиях позволял зарегистрировать только 5-10% примеси в основном веществе. Чувствительность метода MARC не зависит от хроматографического разрешения, а также, поскольку метод MARC использует сразу несколько длин волн, он менее чувствителен к их выбору, чем обычный метод AR.

Рэйд и Вонг [16] предложили использовать коэффициенты корреляции для сравнения цифровых абсорбционных спектров. Фрэнк с сотрудниками [17] применили этот метод для оценки гомогенности хроматографических пиков при шести и более длинах волн. Было показано, что коэффициенты корреляции также более надежны, чем простые AR. Расчет коэффициентов корреляции позволил определить присутствие 2% спектрально похожей примеси, элюирующейся вместе с основным веществом с хроматографическим разрешением, равным всего 0,37.

Кастледин с сотрудниками [18] описал метод множественной корреляции площадей пиков (MPACT, multiple peak-area correlation technique). Этот метод рассчитывает корреляцию между площадями пиков для референтного вещества и образца на семи длинах волн, равномерно распределенных по абсорбционному спектру:

$$r = (\sum A_{1i} \star A_{2i}) / [\sum (A_{1i})^2 \star \sum (A_{2i})^2]^{1/2}, \text{ где}$$

r - коэффициент корреляции;

A_{1i} и A_{2i} - площади пиков на i -ой длине волны для хроматограмм 1 и 2, соответственно.

Поскольку коэффициент корреляции, r , не подчиняется нор-

мальному распределению, он был преобразован в функцию, распределенную нормально, Z , для которой можно провести статистическую оценку с наперед заданным уровнем достоверности:

$$Z = 0.5 \ln[(1 + r)/(1 - r)]$$

Метод МРАСТ позволяет минимизировать влияние вариации отношения сигнал/шум на данные по ходу хроматографического пика, не чувствителен к форме пика, не требует предварительных знаний о спектральных характеристиках возможных примесей, элюирующихся вместе с основным веществом, может использоваться при градиентной элюции, не зависит от хроматографического разрешения. Этот метод дает простой единичный параметр, Z , пригодный для рутинного статистического анализа, и позволяет надежно определить присутствие 1% примеси в основном веществе. По сумме достоинств метод МРАСТ следует признать наилучшим из всех перечисленных в этом обзоре.

Кастледин и Фэлл [19] в обзоре имеющихся на сегодняшний день способов оценки гомогенности и чистоты пиков перечислили 13 "идеальных" характеристик, которым должен отвечать полностью автоматический, точный и надежный метод оценки гомогенности и чистоты пиков, применимый для двух и более частично перекрывающихся пиков. Метод должен:

- уметь определять чистоту пика и число присутствующих компонентов;
- не использовать каких-либо предположений о форме пика;
- обеспечивать заранее определенный уровень надежности;
- адекватно разделять и количественно оценивать компоненты

независимо от уровня хроматографического разрешения;

- быть нечувствительным к шуму;
- не зависеть от степени размывания заднего фронта пика;
- не иметь ограничений по компьютерным возможностям;
- не зависеть от процентного содержания компонентов;
- быть воспроизводимым, правильным и надежным;
- базироваться на одноканальных данных;
- легко вычитать нелинейную и сдвинутую базовую линию;
- не требовать независимых референтных хроматограмм, а также никаких предварительных знаний о присутствующих компонентах;
- работать в реальном времени, либо в строго ограниченных временных рамках.

Совершенно очевидно, что никакой отдельный из имеющихся на сегодняшний день методов не может удовлетворить одновременно всем перечисленным критериям, и аналитик должен каждый раз выбирать подходящий способ, руководствуясь конкретными требованиями и условиями задачи. Все практические методы основаны на различиях сигналов детектора от примеси и основного вещества, которые, в общем, определяются разницей в спектрах поглощения двух веществ. Поскольку ультрафиолетовые и видимые спектры характеризуются недостаточно ярко выраженной структурой, то несмотря на успехи, достигнутые в оценке чистоты пиков, детекция спектрально похожих примесей, элюирующихся одновременно с основным веществом, остается открытой проблемой. Наилучшие из имеющихся способов позволяют определить присутствие около 1% примеси в хроматографическом пике. Проблема осложняется тем, что каждый из способов подвержен влиянию различных мешающих факторов, таких, как шум, дрейф базовой линии, степень хроматографической и спект-

ральной дифференциации и др., которые всякий раз должны приниматься во внимание, когда производятся оценки, близкие к предельным.

Все перечисленные выше способы оценки гомогенности и чистоты хроматографических пиков при использовании фотометрической детекции подразумевают наличие одного обязательного условия: выполнения закона Бугера-Ламберта-Бера для каждого компонента. Отклонения от закона Бера не редки на практике и очень часто связаны с потенциальными источниками нелинейности фотометрических детекторов, некоторые из которых будут рассмотрены в следующей главе обзора. Глубокое понимание и детальный анализ мешающих факторов при многоволновой фотометрической детекции позволят в полном объеме использовать весь потенциал современных методов оценки чистоты и гомогенности хроматографических пиков, изложенный в этом обзоре.

1.2. ПРИЧИНЫ КАЖУЩЕЙСЯ НЕГОМОГЕННОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПИКА, СВЯЗАННЫЕ С ШИРОКОЙ СПЕКТРАЛЬНОЙ ЩЕЛЮ ДЕКТЕКТОРА.

Помимо перечисленных в конце предыдущего раздела факторов, влияющих на неправильную оценку гомогенности хроматографического пика, большое число потенциальных источников негомогенности связаны с отклонениями от закона Бера. Эти отклонения могут вызываться химическими причинами, например, - димеризация, разложение образца. Основными источниками, связанными с фотометрическими детекторами, являются рассеянный свет и недостаток монохроматичности за счет широкой спектральной щели детектора [20]. Тогда, как влияние рассеянного света начинает заметно сказываться

лишь при больших оптических плотностях и поэтому может быть устранено просто выбором подходящего диапазона измерений, нелинейность, связанную с широкой спектральной щелью детектора, учесть и устранить гораздо сложнее. Карр [21] и Макдовэл с сотрудниками [22] показали, что за счет недостаточной монохроматичности света даже при относительно узкой спектральной щели (2нм) фотометрические детекторы имеют значительную нелинейность при довольно низких концентрациях (1мМ) веществ и величине поглощения намного ниже предела, определяемого рассеянным светом в приборе.

Поскольку спектральная ширина щели спектрофотометрических хроматографических детекторов может достигать 5 - 20 нм, необходимо иметь четкое представление о масштабах ее влияния на величину измеряемой оптической плотности, характер отклонений от закона Бера и искажений в форме спектров исследуемых веществ. Данному вопросу посвящено много публикаций [20-33].

Еще в 1937 году Хогнис с сотрудниками [23] предложили способ определения спектральной ширины щели монохроматора (ширина выходной щели плюс проекция входной щели на план выходной в единицах длины волны с учетом дисперсии инструмента) и провели сопоставление спектров щелочного хромата калия при спектральных щелях разной ширины.

Бэк с сотрудниками [24] в 1958 году показали, что если абсорбционная характеристика поглощающего свет вещества значительно изменяется с позицией внутри спектральной щели конечной ширины, то для центральной линии щели средняя абсорбция обычно не соответствует действительной абсорбционной характеристике вещества в этой точке.

Кузякова с сотрудниками [25] провели расчеты и эксперименты

по проверке влияния ширины спектрального интервала светофильтров на линейность и чувствительность выходной характеристики медицинских абсорбциометров. Они показали, что расширение спектрального интервала также, как и сдвиг максимума пропускания светофильтра по отношению к абсорбционному максимуму вещества, вызывает отклонения от линейности и уменьшение чувствительности абсорбциометра.

Вэнфворс [26] обсудил влияние ширины щели монохроматора и ширины спектральной полосы поглощения вещества на отклонение от закона Бера.

Многие авторы пытались рассчитать ошибки в абсорбционных измерениях, вызываемые использованием немонахроматического света. Алгоритм расчета различий между измеряемой и истинной оптической плотностью в зависимости от ширины щели у большинства авторов сходный: задаются функция, описывающая форму щели (аппаратная функция), и другая функция для описания формы спектральной полосы поглощения вещества (истинного спектра); ожидаемое поглощение в заданной точке спектра рассчитывается с помощью интегрирования при последовательном сканировании истинного спектра щелью.

Так, Эберхард [27] провел расчет для треугольной формы щели для монохроматоров с переменной по спектральному диапазону дисперсией (призменные монохроматоры). Форма истинного спектра вблизи максимума задавалась двумя различными функциями - параболической и двумя пересекающимися прямыми с противоположными наклонами. Агдерденбос и Винк [28] предложили параболическую функцию и для щели, и для абсорбционной кривой. Торкингтон [29] нашел, что наилучшим приближением спектра вещества является подхо-

дующая комбинация функций Гаусса и Лорентца. Стронг [30] использовал треугольную форму для щели и функцию Гаусса для спектра вещества. Результаты, представленные Стронгом, включают таблицы для расчета действительного отношения спектральной ширины щели к ширине полосы поглощения из экспериментальных величин; ошибки, связанные с отклонениями от закона Бера для данных отношений; уравнения для расчета действительных оптических плотностей и коэффициентов экстинкции.

Наибольший вклад в исследование влияния ширины щели на абсорбционные измерения внесли Доуз и Гишон [31]. Они провели расчет для двух разных принципов работы спектрофотометрических детекторов: с усреднением по оптической плотности и с усреднением по пропусканию. Первый принцип заложен в работе большинства детекторов с диодной матрицей, второй - в детекторах с монохроматором и с отдельным фотоприемником. Приборы, основанные на двух разных принципах, имеют фундаментально различные зависимости измеряемой оптической плотности от формы спектра, концентрации вещества, ширины щели детектора.

Расчет влияния ширины щели для детекторов с усреднением по оптической плотности не представляет затруднений, т.к. является простым арифметическим усреднением по всему числу (n) составляющих спектральную щель диодов. Для этих детекторов практически отсутствует вызванная широкой щелью нелинейность калибровочных кривых, во всяком случае, она приблизительно в n^2 раз меньше, чем для детекторов, усредняющих по пропусканию. Однако, детекторы с диодной матрицей имеют плохое отношение сигнал/шум при высоких оптических плотностях по сравнению с детекторами, усредняющими по пропусканию.

Расчет влияния ширины щели для детекторов с усреднением по пропусканию Доуз и Гишон [31] проводили для прямоугольной щелевой функции, спектр вещества моделировали рядом Тейлора.

Авторы представили модели, описывающие зависимость измеряемой оптической плотности от ширины щели детектора и формы спектра вещества. Они показали, что нелинейность калибровочных кривых (отклонение от закона Бугера-Ламберта-Бера) имеет приблизительно квадратичную зависимость от произведения ширины щели детектора и спектрального наклона (первая производная спектра вещества по длине волны), причем калибровочные кривые всегда искривлены вниз. Изменение наклона калибровочного графика на прямолинейном участке (по сравнению с наклоном при узкой щели) пропорционально произведению квадрата ширины щели детектора и второй локальной производной спектра вещества, причем наклон калибровочного графика может как увеличиваться, так и уменьшаться в зависимости от знака этой производной (плюс или минус, соответственно).

Из этих общих правил сделаны более конкретные выводы: хотя калибровочные кривые, построенные для длин волн вблизи спектрального максимума, линейны до высоких концентраций, коэффициенты молярной экстинкции, измеренные с ненулевой щелью детектора, для этих длин волн сильнее отличаются от истинных, чем измеренные при очень низких концентрациях вблизи точки перегиба в спектре вещества. Правильность коэффициентов молярной экстинкции имеет большое значение при идентификации веществ, при сравнении калибровочных кривых для разных детекторов.

При выборе длины волны для УФ-детекции следует искать компромисс между линейностью калибровки и правильностью измерения поглощения. Но поскольку для хроматографистов линейность более

важна, чем точные значения коэффициентов экстинкции, обычно выбирают длину волны вблизи максимума поглощения.

Данные по влиянию ширины щели детектора, приведенные разными авторами, позволили оценить погрешность измерения оптической плотности в зависимости от отношения полуширины щели монохроматора к полуширине спектральной полосы поглощения вещества для различных интервалов оптических плотностей [29,30]; количественно описать отклонения от линейности, возникающие при больших оптических плотностях за счет широкой щели [26,28,30,31], и изменение наклона калибровочных кривых [31].

Авторы получили достаточно хорошее совпадение рассчитанных и экспериментальных данных для случая достаточно узких спектральных щелей [30,31], однако, совпадение было тем хуже, чем более широкие щели рассматривались, причем, эти факты невозможно было объяснить плохим приближением функций, описывающих форму щели монохроматора и спектра вещества. Доуз и Гишон, например, анализируя полученные экспериментальные данные, отмечают, что для точки перегиба в спектре вещества совпадение между предсказанным и наблюдаемым отклонением от линейности прекрасное, однако наклон калибровочной кривой на линейном участке предсказывается плохо и причина этого факта непонятна.

Общим недостатком всех перечисленных подходов к расчету влияния ширины щели на форму спектра поглощения вещества является исключение из рассмотрения крутизны оптического тракта - зависимости от длины волны суммарной характеристики, включающей интенсивность источника света, спектральный коэффициент пропускания оптического канала, спектральную чувствительность фотоприемника. Поскольку учет этой составляющей по ширине щели привел

бы к значительному усложнению всех расчетов, ее полагают постоянной в пределах щели. В работе [30] приведен даже вид оптического тракта, снятый для спектрофотометра Spectronic 20 в видимом диапазоне, однако, при расчетах он необоснованно игнорируется. Авторы полагают, что, поскольку в пределах щели его можно рассматривать как прямолинейный, то уменьшение вклада в поглощение с одной стороны от средней длины волны компенсируется увеличением вклада с другой стороны. Доуз и Гишон [31] прямо указывают на то, что причиной плохого совпадения некоторых рассчитанных и экспериментальных результатов является неучтенная зависимость интенсивности падающего света и чувствительности фотоприемника от длины волны.

Таким образом, предложенные методы позволяют оценить многие эффекты, обусловленные спектральной щелью конечной (ненулевой) ширины, и в некоторых случаях откорректировать результаты измерений; однако такой важный источник искажений результатов, как крутизна оптического тракта, остался не рассмотренным, чем и можно объяснить недостаточно полное совпадение расчетных и экспериментальных данных. Поэтому необходимо продолжить исследования по выяснению вклада каждого из основных приборных факторов, влияющих на измеряемую оптическую плотность (и в частности, крутизны оптического тракта) с целью последующего их учета при обработке многоканальных многокомпонентных хроматограмм современными математическими методами.

1.3. ПРИЧИНЫ КАЖУЩЕЙСЯ НЕГОМОГЕННОСТИ ПИКА, СВЯЗАННЫЕ С НЕРАВНОМЕРНЫМ РАСПРЕДЕЛЕНИЕМ ВЕЩЕСТВА В КЮВЕТЕ.

Все расчеты и выводы о влиянии ширины щели детектора на измеряемую оптическую плотность, изложенные в предыдущем разделе, справедливы в предположении об однородном распределении поглощающего вещества в кювете. Однако, в настоящее время имеется ряд экспериментальных данных, свидетельствующих о несоблюдении этого предположения.

Так, Торси и другие [34,35] при определении абсолютного количества анализируемого вещества по площади хроматографического пика с использованием стандартного оборудования и UV детекторов получили завышенные значения суммарного количества вещества в некоторых случаях. Систематическая ошибка достигала 18%. Авторы справедливо связывают эти отклонения с комбинированным влиянием на измеряемую оптическую плотность концентрационных градиентов при прохождении вещества через кювету и отклонением световых лучей в присутствии этих градиентов.

Глик с сотрудниками [36] еще в 1951 году пытались оценить ошибку измерения поглощения, связанную с неоднородным распределением поглощающего вещества в луче, с учетом доли площади луча, занимаемой поглощающим свет веществом. Они предложили формулу, позволяющую учесть разницу в поглощении:

$$A/A_q = - 0.434 \epsilon c l / \lg [1 - 1/q + (1/q)\exp(-\epsilon c q l)], \text{ где}$$

A - истинное поглощение вещества;

A_q - измеренное поглощение;

q - доля площади луча, занимаемая поглощающим веществом;
остальные обозначения стандартные для закона Бера.

В настоящее время типичной кюветой для хроматографического детектора является конусная ячейка с "Z" -образными подводами. Такая конструкция позволяет минимизировать застойные зоны и уменьшить размывание пика [37], однако появляются новые проблемы, связанные со сложно зависимым от времени перемешиванием пробы в кювете.

Пек и Моррис [38] использовали метод фотографирования тени для визуализации прохождения пробы вещества через хроматографическую ячейку "Z" -образной геометрии. Они фотографировали прохождение зоны метилоранжа (20мкл) в чистой воде через ячейку детектора с длиной и диаметром 1 мм при элюировании ее смесью метанол/ вода 60:40 и регистрировали изменение коэффициентов преломления, связанное с неполным смешиванием пробы. Было показано, что в типичных хроматографических условиях наблюдается неполное перемешивание пробы и детали потока пробы сильно зависят от конструкции ячейки. Выводы были наглядно проиллюстрированы фотографическим изображением прохождения пробы через ячейку с двухсекундными интервалами. Авторы делают вывод о невозможности создания простой геометрии ячейки, обеспечивающей полное перемешивание и однородный поток.

Камахори с сотрудниками [39] провели компьютерный расчет профиля потока пробы (бензол в метаноле) в кювете "Z" -образного типа объемом 0.6 мкл на суперкомпьютере HITAC S-810. Они показали, что для "Z" - образной ячейки присутствует три типа потока:

- при скорости ниже 0.2 мл/мин - ламинарный поток;

- при скорости выше 1 мл/мин - две разновидности потока: ламинарный плюс так называемый смешанный (не зависящий от скорости и пропорциональный квадрату объема ячейки);

- при скорости от 0.2 до 1 мл/мин - промежуточное состояние между первым и вторым. Этот тип потока в наибольшей степени зависит от формы ячейки, подводющих капилляров и способа их соединения с ячейкой.

Стоун и Тайсон [40], рассмотрев влияние геометрии ячейки на форму пика и дисперсию, на примере четырех стандартных абсорбционных ячеек различного объема и конструкции (с объемами 0.6, 8, 25 и 60 мкл), пришли к аналогичным выводам о влиянии скорости потока на его профиль: диффузионно - конвективный механизм преобладает при низких скоростях, при более высоких скоростях увеличивается вклад турбулентности. Авторы приходят к выводу о невозможности получить точное решение уравнения конвекции - диффузии для конкретной ячейки из-за нарушения профиля первичного потока за счет появления множества непредсказуемых вторичных потоков, вводимых изгибами подводных проводов, соединительными точками и др. Авторы делают вывод о необходимости тщательного выбора типа используемой ячейки и оптимизации ее объема для конкретного вида анализа.

Таким образом, приведенные литературные данные свидетельствуют о том, что к настоящему времени нет каких - либо значительных исследований по учету неоднородности распределения вещества в пределах спектральной щели, вызванной изменением концентрации вещества при прохождении пробы через кювету детектора. Объясняется это разнообразным характером и крайней сложностью описания происходящих в кювете процессов. В связи с этим представляют ин-

терес любые, даже самые простые модели учета неоднородности распределения вещества в кювете, помогающие продвижению вперед в этом направлении.

1.4. СПОСОБЫ УМЕНЬШЕНИЯ ПРОДОЛЬНОГО РАЗМЫВАНИЯ ЗОНЫ ВЕЩЕСТВА В РЕАКТОРАХ - СМЕСИТЕЛЯХ ДЛЯ ГРАДИЕНТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ПОСТКОЛОНОЧНОЙ ДЕРИВАТИЗАЦИИ.

В анализе методом ВЭЖХ для детектирования соединений, не поглощающих в УФ- или видимой области спектра и неспособных флуоресцировать, их часто переводят в подходящие поглощающие производные либо до, либо после хроматографического разделения. В ряде случаев дериватизацию проводят с целью повышения селективности или чувствительности определения. При постколоночной дериватизации выходящий из колонки элюат, содержащий разделенные компоненты пробы, смешивается с необходимым реагентом и вводится в реактор, в котором и происходит образование необходимых производных. Продукты этой реакции далее детектируются с помощью фотометрического, флуориметрического или электрохимического детектора. Для проведения реакции применяются реакторы различных типов, но любой из этих реакторов неизбежно приводит к дополнительному внеколоночному размыванию пиков, устранить которое чрезвычайно трудно. Проблемы, связанные с размыванием, возникают также и при создании градиентных насосов, которые должны обеспечивать минимальное искажение задаваемого градиента.

В предыдущем разделе были описаны процессы размывания зоны вещества в кювете детектора, которая также, как и подводящие капилляры, тройниковые смесители, колонки, является одним из инди-

видуальных компонентов трубопроводов в хроматографических или проточно - инъекционных системах. Поскольку математическое описание размывания зоны вещества в отдельных элементах трубопроводов является очень сложной задачей, преобладают в основном эмпирические подходы.

Описание процессов размывания зоны вещества непосредственно в самих трубопроводах различной геометрии также, как и в отдельных их элементах, представляют большой практический интерес в плане оптимизации различных конструктивных элементов хроматографической системы, в частности, смесителей для градиентных насосов, что и будет предметом рассмотрения этого раздела.

Стационарный ламинарный поток в цилиндрических трубах характеризуется параболическим профилем скоростей: скорость потока в центре трубы максимальна, в то время, как вблизи стенок равна нулю. Эта разница в скоростях от стенок трубы до ее центра вызывает значительное размывание зоны вещества, инжесктированного в поток носителя, при прохождении его по трубе. Если, однако, параболический профиль скоростей удастся нарушить подходящим способом, размывание зоны в трубе может быть значительно уменьшено. Это достигается увеличением интенсивности радиального массопереноса путем создания локальной турбулентности, когда направление потока резко изменяется. При этом элементы жидкости, которые запаздывали из-за близости к стенкам канала, сдвигаются в быстро продвигающиеся центральные линии потока, в то время, как элементы жидкости из центра смещаются ближе к стенкам трубы. Чем чаще повторяется этот процесс, тем более симметричный концентрационный градиент в пределах размытой зоны образца наблюдается, и форма зоны становится более симметричной.

Уменьшение продольного размывания зоны до минимума при одновременном увеличении радиального смешивания путем введения вторичных потоков является необходимым условием при построении смесителей для градиентных насосов и реакторов - смесителей для постколониальной дериватизации в хроматографии.

Геометрически деформированные трубки и каналы позволяют внести определенные изменения в направление потока и тем самым способствуют уменьшению размывания образца по сравнению с прямым идеальным капилляром.

Для сопоставления способности геометрически деформированных реакторов "сбивать" параболу скоростей необходимо подобрать подходящие критерии.

Для описания перехода от ламинарного к турбулентному потоку Хофман и Халаз [41, 42] приводят величину гидродинамической проницаемости как функции средней линейной скорости потока, вытекающей из уравнения Хагена - Пуазейля:

$$K_{эф} = U * \eta * L / \Delta P \quad , \text{ где}$$

U - скорость потока, см/сек;

η - динамическая вязкость, дин*сек/см²

L - длина капилляра, см;

ΔP - перепад давления, дин/см²;

$K_{эф}$ - эффективная гидродинамическая проницаемость, см².

Гидродинамическая проницаемость остается практически постоянной при увеличении линейной скорости потока вплоть до наступления турбулентного режима, где происходит резкое скачкообразное

ее уменьшение. Поэтому Хофман и Халаз отмечают, что относительное уширение зоны, выраженное в терминах длины смешивания (которую можно описать в терминах высоты, эквивалентной теоретической тарелке, ВЭТТ), предпочтительнее, т.к. ВЭТТ является более чувствительной функцией к типу потока, чем $K_{эф}$, что авторы и подтверждают экспериментально.

Длину смешивания, H , обычно рассчитывают в сантиметрах, она прямо связана с дисперсией, которая может быть выражена в единицах длины, времени или, например, объема:

$$H = L/N = L(\delta v)^2 / v^2, \text{ где}$$

N - число теоретических тарелок;

$(\delta v)^2$ (мкл²) - аксиальная дисперсия, выраженная в единицах объема;

V (мкл) - объем реактора;

L (см) - длина реактора.

Эффективность деформации параболического профиля скоростей можно оценить сравнением ВЭТТ для прямых трубок (H_0) и ВЭТТ в присутствии вторичных потоков (H) в виде отношения H_0/H , либо в виде отношения соответствующих дисперсий, определенных в идентичных экспериментальных условиях:

$$H_0 = 2D_m/U + R^2 \star U / 24D_m$$

$$H = 2D_m/U + 2K \star R^2 \star U / D_r, \text{ где}$$

R - радиус трубы, см;

- U - средняя линейная скорость потока, см/сек;
 D_m - коэффициент молекулярной диффузии, см²/сек;
 D_r - коэффициент радиальной дисперсии, см²/сек;
 K - фактор профиля скоростей.

В выражении для ВЭТТ первый член описывает аксиальную дисперсию, второй - радиальную; D_r учитывает вклад от молекулярной диффузии и вторичных потоков, D_r и K оба являются функциями скорости потока и геометрии реактора.

Катц и Скотт [43] используют понятие действительной объемной вариации пика на единицу длины трубы (в квадратных микролитрах на сантиметр). Они полагают, что эта величина более полезна в хроматографии, чем ВЭТТ, т.к. позволяет напрямую выделить вклад, вносимый в уширение зоны соединительными проводами, без дополнительных математических расчетов.

Ружичка и Хансен [44, 45] для описания дисперсии зоны в проточно - инъекционных системах предложили фактор $\beta_{1/2} = s/V_r$, где s - объем образца, необходимый для достижения уровня сигнала, соответствующего 50% от максимального (платового) значения; V_r - объем реактора. $\beta_{1/2}$ - безразмерное число, величина которого зависит от геометрии канала, его длины, диаметра, скорости потока, и чем ниже его значение, тем больше интенсивность радиального массопереноса и тем эффективнее система. Авторы считают, что фактор $\beta_{1/2}$ включает действительные параметры системы и поэтому ведет к реалистической оценке размывания лучше, чем классические параметры, такие, как N (число теоретических тарелок), ВЭТТ, дисперсия зоны, которые могут быть получены при инжектировании неопределенно короткого импульса, но имеют преимущества

точной теоретической оценки.

По нашему мнению, оценка размывания зоны в терминах ВЭТТ наиболее приемлема, т.к. ВЭТТ является достаточно чувствительной функцией к типу потока, адекватно оценивает размывание зоны, проста и универсальна.

Явление радиального массопереноса в деформированных трубках и каналах различной геометрии экспериментально изучали многие авторы [41 - 49]. Хофман и Халаз [41, 42] описали свитые в спираль круглого сечения (coiled), сжатые овального сечения (squeezed), сжатые, закрученные винтом и свитые в спираль (twisted), а также волнообразные (wavy) трубки. Кацт и Скотт [43] показали преимущества зигзагообразной, или серпентиновой трубки, полученной пропусканием тонкостенного капилляра через тщательно согласованную пару зубчатых шестерен и помещенной внутрь прямой трубы большего диаметра.

Энгельгардт [46] предложил вязаный (knitted) реактор. Наиболее просто его можно изготовить плотным и нерегулярным связыванием узлами трубок подходящей длины и диаметра. Вязаные капилляры являются наиболее эффективными для уменьшения размывания зоны и работают в более широком интервале скоростей, чем другие. К тому же, машинным вязанием можно получить реактор до 40 метров длиной, что очень важно для проведения медленных реакций при постколлоночной дериватизации. Теоретическое описание дисперсионных процессов в геометрически деформированных трубках находится еще на начальной стадии, однако эффект синусоидальной дезориентации, достигаемой связыванием трубок, может быть смоделирован и предсказывает 25 - кратное уменьшение размывания по сравнению со свитыми в спираль трубками при низких скоростях потока, где до-

биться небольшой дисперсии наиболее трудно.

Впечатанные и выгравированные в прозрачных твердых пластинах синусоидальные и "Z" -образные каналы с полукруглым сечением были изготовлены с той же целью для проточно - инъекционных интегрированных микротрубопроводов Ружечкой и Хансеном [44, 45]. Такой канал имеет низкую стоимость и может быть легко воспроизведен с высокой точностью таким образом, что реактор, инжектор, детектор и другие компоненты будут интегрированы в единое целое без дополнительно размывающих зону связующих элементов.

Сравнение дисперсионных факторов для реакторов различной геометрии представлено в таблице 1.1 [45].

Таблица 1.1. Сравнение дисперсионных факторов для реакторов различной геометрии. $U = 6.25$ см/сек.

Тип реактора	Площадь поперечн. сечения (мм ²)	V_r (мкл)	s (мкл)	$\beta_{1/2}$	H (см)
микролинии:					
прямые	0.2	173	70.6	0.41	3.6
свитые в спираль	0.2	194	66.4	0.34	2.8
вязаные	0.2	184	41.5	0.23	1.2
микротрубопроводы:					
синусоидальные	0.8	136	46.0	0.34	0.5
"Z" -образные	0.8	150	46.0	0.29	0.4

Данные получены с бромтимоловым синим в $10^{-2}M$ тетраборате натрия с добавлением 0.05% Brij-35. $H=(0.25V_r/s)\beta_{1/2}^2$.

Как видно из таблицы, синусоидальные и "Z"-образные микротрубопроводы более эффективны по сравнению с деформированными трубками (выше эффективность при больших сечениях), т.к. технология позволяет значительно уменьшить прямые участки (на которых формируется парабола скоростей) и углы поворота канала, что обеспечивает лучшую дезориентацию потока на единицу длины, в то время, как для капилляров существуют ограничения на изгиб из-за конечной толщины стенок капилляра.

Таким образом, геометрическая деформация канала в прозрачных твердых пластинах - наиболее предпочтительный путь увеличения эффективности радиального перемешивания при одновременном уменьшении аксиального размывания задаваемого профиля. Кроме того, по сравнению с реакторами, упакованными твердыми частицами [48] (которые также часто применяются для аналогичных целей), геометрически деформированные каналы имеют более низкое сопротивление потоку и более высокое отношение объем/поверхность, что уменьшает возможные нежелательные взаимодействия раствора со стенками канала.

1.5. ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ДЕТЕКТОРЫ.

Флуориметрия обычно в 10 - 1000 раз более чувствительный и по сути более специфичный метод, чем спектрофотометрия. В детекторах, основанных на поглощении излучения, измеряемый сигнал представляет собой небольшое изменение на интенсивном фоне. При

флуоресцентном детектировании, наоборот, сигнал, хотя и слабый, измеряется на темном фоне. Это позволяет применять в системе регистрации сигнала устройства с большим коэффициентом усиления. Поэтому неудивительно, что исследователи обращаются к флуориметрии при необходимости определять концентрации вещества на уровне ниже 10^{-6} моль/л. ВЭЖХ с флуориметрической детекцией в настоящее время является одним из наиболее быстро развивающихся методов жидкостной хроматографии. Этот метод комбинирует высокоэффективные разделительные возможности ВЭЖХ с хорошей чувствительностью и селективностью флуориметрической детекции.

Детектирующие флуоресцентные системы существенно отличаются от систем, основанных на поглощении излучения. При флуоресцентном детектировании проточная ячейка облучается ультрафиолетовым излучением, которое возбуждает молекулы элюируемой пробы. Далее эти молекулы испускают во всех направлениях флуоресцентное излучение. В принципе его можно наблюдать под любым углом, однако на практике интенсивность флуоресценции обычно измеряют в направлении, перпендикулярном направлению возбуждающего излучения. Благодаря этому последнее не мешает наблюдению флуоресценции, и в результате снижается фон и шум.

Поскольку источником флуоресцентного излучения являются возбужденные молекулы определяемого компонента, то его интенсивность должна быть пропорциональна числу облученных молекул и, следовательно, объему раствора, подвергнутого облучению. Однако абсолютную интенсивность реально наблюдаемого флуоресцентного излучения вычислить не удастся по трем причинам. Во-первых, интенсивность возбуждающего облучения ослабляется по экспоненциальному закону вследствие поглощения его по мере проникновения в

раствор. Во-вторых, испускаемое молекулами вещества флуоресцентное излучение также поглощается раствором. И наконец, выходной сигнал детектора в значительной мере зависит от эффективности светосбора при измерении флуоресценции. Поэтому интенсивность флуоресценции (или, точнее, выходной сигнал флуоресцентного детектора) всегда выражается в произвольных или относительных единицах, и, как следствие, флуоресцентный детектор (в отличие от фотометрического детектора) не позволяет проводить никаких абсолютных измерений.

Флуориметрические детекторы могут быть разбиты на группы по разным принципам, например, по типу монохроматора [50]:

- фильтр/ фильтр;
- монохроматор/ фильтр;
- монохроматор/ монохроматор (спектрофлуориметр).

Система первого типа (фильтр/ фильтр) недорога и пригодна для серийного анализа. В качестве источника возбуждения широкое распространение получили ртутные лампы. Излучение этих ламп содержит лишь несколько дискретных линий с определенными длинами волн. Чаще всего используются длины волн 254 и 365 нм; другие линии применяются реже из-за относительно слабой энергии излучения и отсутствия подходящих оптических фильтров.

Система второго типа (монохроматор/ фильтр) более селективна и универсальна, поскольку оператор может выбрать для возбуждения излучение с любой длиной волны. Для детекторов этого типа в качестве источников возбуждающего излучения применяются лампы с непрерывным спектром испускания, например ксеноновые или дейтериевые.

Система третьего типа (монохроматор/ монохроматор) наиболее

селективна и универсальна, поскольку длина волны как возбуждающего, так и измеряемого вторичного излучения может быть произвольно выбрана оператором. В некоторых случаях с помощью спектрофлуориметра удается детектировать искомое соединение в группе плохо разделенных хроматографических пиков. Некоторые спектрофлуориметры могут быть использованы также в системах фильтр/фильтр и монохроматор/фильтр с применением возбуждающего излучения так называемого нулевого порядка и подходящих светофильтров. Излучение нулевого порядка получается путем поворота спектральной решетки на такой угол, при котором решетка начинает работать как зеркало. В спектрофлуориметрических детекторах, специально предназначенных для ВЭЖХ, ширину щели монохроматора устанавливают большей, чем в спектрофлуориметрах общего назначения (обычно 10 - 20 нм), чтобы повысить чувствительность анализа.

Характеристики некоторых фильтровых детекторов представлены в таблице 1.2. В таблице 1.3 представлены характеристики детекторов второго и третьего типа [51].

Следует обратить внимание на удачную конструкцию кюветы флуориметрического детектора фирмы "Кратос" [51, 52, 53]. Схема этой кюветы, обеспечивающей эффективное измерение флуоресценции в малом объеме жидкости, наиболее близка к схеме, реализованной для "Милихрома-4М-Ф". Кювета освещается лучом возбуждающего ультрафиолетового излучения, которое падает на зеркало с тыльной стороны и проходит сквозь прозрачное отверстие в его центре. Флуоресцентное излучение собирается тем же вогнутым зеркалом, имеющим большой угол захвата. Эмиссионное излучение регистрируется фотоприемником в направлении хода луча возбуждающего света,

который отсекается специальным фильтром.

Таблица 1.2. Характеристики некоторых фильтровых детекторов.

Фирма, модель	Страна	Объем ячейки (мкл)	λ возбуждения	λ эмиссии
Жильсон 121	Франция	0.6; 9.0	200 - 650	320 - 800
Пай- Юникам 4024	Велико- британия	25	360	400; 470
Кнауэр 8250	Германия	8	250 - 430	570; 408
Кратос 950	США	5	214 - 545	300 - 650

Другой принцип классификации флуориметрических детекторов предложен Сесилом и Рутаном [54] в связи с бурным развитием методов обработки многоканальных данных. Большинство флуориметрических детекторов являются так называемыми детекторами первого порядка: они поставляют данные первого порядка (данные с одной независимой переменной, например, временем удерживания). Такие

Таблица 1.3. Характеристики некоторых детекторов с монохроматорами и комбинированных детекторов.

Фирма, модель, страна	λвозб.	Диспер- гирующий элемент	λэмисс.	Диспер- гирующий элемент	Источник света	Объем ячейки (мл)
Завод "ОПП"						
Ж-1311 г. Минск	200-650	монохро- матор	300-750	12 фильтров	D-лампа	0.1
Бекман 157 США	300-800	монохро- матор	300-800	монохро- матор	Кварцевая галогенная лампа	0.6; 9.0
Вариан 2070 США	240-650	монохро- матор	240-650	монохро- матор	Хе-лампа	15.0
Кратос FS-970 США	190-400 380-700	монохро- матор	280-700	фильтр	D-лампа W-лампа	5.0

флуориметрические детекторы работают при фиксированной длине волны возбуждения и регистрируют либо суммарную флуоресценцию, либо флуоресценцию при определенной выбранной длине волны эмис-

сии. Хотя детекторы первого порядка (одноканальные детекторы) просты, надежны, недороги, они не могут решить некоторые проблемы. Эти проблемы включают флуктуации интенсивности флуоресценции, влияние рассеянного света, вариации базовой линии, количественный и качественный анализ перекрывающихся спектральных и хроматографических данных.

Детекторы следующего поколения (многоканальные детекторы) поставляют значительно больше информации. Они выдают данные как функцию двух независимых переменных, в случае флуориметрических детекторов - это время элюирования и длина волны возбуждения или эмиссии. Первые многоканальные флуориметрические детекторы были предложены в 1970-х - 1980-х годах, но методы анализа многоканальных данных не были еще достаточно развиты. В настоящее время такие детекторы снова начинают привлекать внимание [55, 56].

Сесил и Рутан [54] предложили многоканальный флуориметрический детектор, основанный на коммерческом спектрофлуориметре "Farrand MKI" с модифицированной оптикой и детектором с диодной матрицей вместо фотоприемника. Конструкция оптики такова, что 200 нм интервал эмиссионного спектра может попадать на диодную матрицу. Таким образом, хроматограф с модифицированным спектрофлуориметром может регистрировать данные для двух независимых переменных - времени элюции и длины волны эмиссии.

Для демонстрации возможностей нового спектрофлуориметра оценивались предел обнаружения и линейный динамический диапазон для трех веществ: антрацена, перилена и бенз(а)пирена, которые были выбраны по двум причинам. Во-первых, именно эти вещества наиболее часто используются исследователями для такого типа флуориметрических измерений; во-вторых, эмиссионные спектры каждого

из веществ попадают в разные области спектрального диапазона. Предел обнаружения составил около 1мкМ (100 нг в пробе) для каждого из веществ. Линейный динамический диапазон флуориметра составляет по крайней мере три порядка величины. Сесил и Рутан показали возможность создания относительно дешевого многоканального флуориметрического детектора с приемлемыми пределами обнаружения. Было также показано, что необходимо более эффективно использовать многоканальные данные в области флуоресцентной спектроскопии, где много физических и химических факторов может влиять на правильность результатов. В частности, используя эмиссионные спектральные данные, можно эффективно корректировать вариации времен удерживания при градиентной элюции, вычленять примеси в перекрывающихся пиках, а также идентифицировать разделяемые вещества.

Дэс и Томас [57] использовали флуориметрический хроматографический детектор с изменяемой длиной волны возбуждения для определения девяти полициклических ароматических углеводородов. Детектор имел кювету объемом 5 мкл, был оснащен дейтериевой лампой (190 - 400нм), а также набором эмиссионных отсекающих фильтров для выбора интересующего интервала эмиссионного спектра. Были получены пределы обнаружения, близкие к субпикограммовому уровню: бенз(а)антрацен - 0.6 пикограмм, бенз(а)пирен - 1.1 пикограмм с относительным стандартным отклонением от 0.32 до 2.66%.

В заключение следует еще раз отметить, что флуориметрические детекторы являются в настоящее время одними из самых чувствительных в жидкостной хроматографии. Кроме того, они отличаются достаточно высокой линейностью и регулируемой селективностью.

Поэтому не вызывает сомнений целесообразность дальнейшего расширения работ в этой области, перспективность которых очевидна. Особое внимание следует обратить на разработку детекторов, которые поставляют значительный объем многоканальных данных, что позволяет воспользоваться методами обработки таких данных, изложенными в первой главе данного обзора.

1.6. ИСТОРИЯ МИКРОКОЛОНОЧНОГО ЖИДКОСТНОГО ХРОМАТОГРАФА "МИЛИХРОМ".

История микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром" - инструмента для аналитического разделения, идентификации и количественного определения компонентов растворов сложных смесей веществ - специалистам хорошо известна.

В 1967 г. молодыми энтузиастами - сотрудниками НИОХ СО АН СССР Л.С.Сандахчиевым и С.В.Кузьминым была начата разработка лабораторной установки для хроматографии в ультрамикромасштабе, успешно выполненная менее, чем за год.

Хорошо представляя себе перспективность начатой работы, авторы, к которым подключился (и впоследствии возглавил работу) М.А. Грачев, продолжили разработку с прицелом на создание уже прибора. К 1976 г. была проработана до мелочей концепция будущего прибора. Доведение концепции до начала серийного производства потребовало еще пять лет напряженнейшего труда - 30 декабря 1981 г. Госкомиссия в г.Орле приняла разработку хроматографа, названного авторами "Обь-4" [58], получившего торговое название "Милихром". Это событие было бы невозможным без тесной кооперации учреждений СО АН СССР: НИОХ, ИЯФ, СКТБ СЭИАП, Опытный завод, а

также орловское ПО "Научприбор". Основной состав команды разработчиков: Л.С.Сандахчиев, С.В.Кузьмин, М.А.Грачев, Э.А.Купер, В.В.Каргальцев, Г.И.Барам, Ю.А.Болванов, М.П.Перельройзен.

Хроматограф по ряду параметров (на 1982 год) не имел аналогов нигде в мире. В 1985 г. авторский коллектив был удостоен государственной премии СССР.

Параллельно разворачиваются интенсивные работы по совершенствованию прибора. Разрабатываются алгоритмы, интерфейс и программа сбора и обработки данных для персонального компьютера. В 1985 г. появляется модификация "Милихром-1". Полностью перерабатывается электроника прибора под ставшую доступной микропроцессорную элементную базу, при этом разрабатываются новые алгоритмы и программное обеспечение встроенного микропроцессора; параллельно разрабатывается новое механическое устройство (автодозатор); в итоге в 1987 г. в серию запускается принципиально новая модификация - "Милихром-2", позднее усовершенствованная ("Милихром-4"). Дальнейший путь совершенствования хроматографа - разработка современной системы обработки многоканальных данных [59] и создание портативного варианта для мобильных лабораторий с встроенным градиентным насосом - "Милихром-А-02"[60].

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.

ГЛАВА 2.

ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОЙ ШИРИНЫ ЩЕЛИ МОНОХРОМАТОРА
НА ФОРМУ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ВЕЩЕСТВ.

В главе 1.2 литературного обзора 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 2.1, например, показаны оптические тракты для четырех детекторов хроматографа "Милихром-4"), важно иметь представление о том, в каких случаях необходимо учитывать эти различия.

В этой главе рассмотрено совместное влияние ширины щели монохроматора и крутизны оптического тракта в пределах щели на форму спектра поглощения вещества и отклонение от линейности калибровочных кривых. Данное исследование позволяет, во-первых, оценить возможность идентификации веществ: моделировать и учитывать отклонения в каждом конкретном случае, а также сопоставлять спектральные данные, полученные на различных приборах; и во-вторых, объяснить некоторые причины кажущейся неомогенности хроматографического пика заведомо чистого вещества, понимание которых позволяет обходить возникающие трудности путем правильного выбора условий эксперимента.

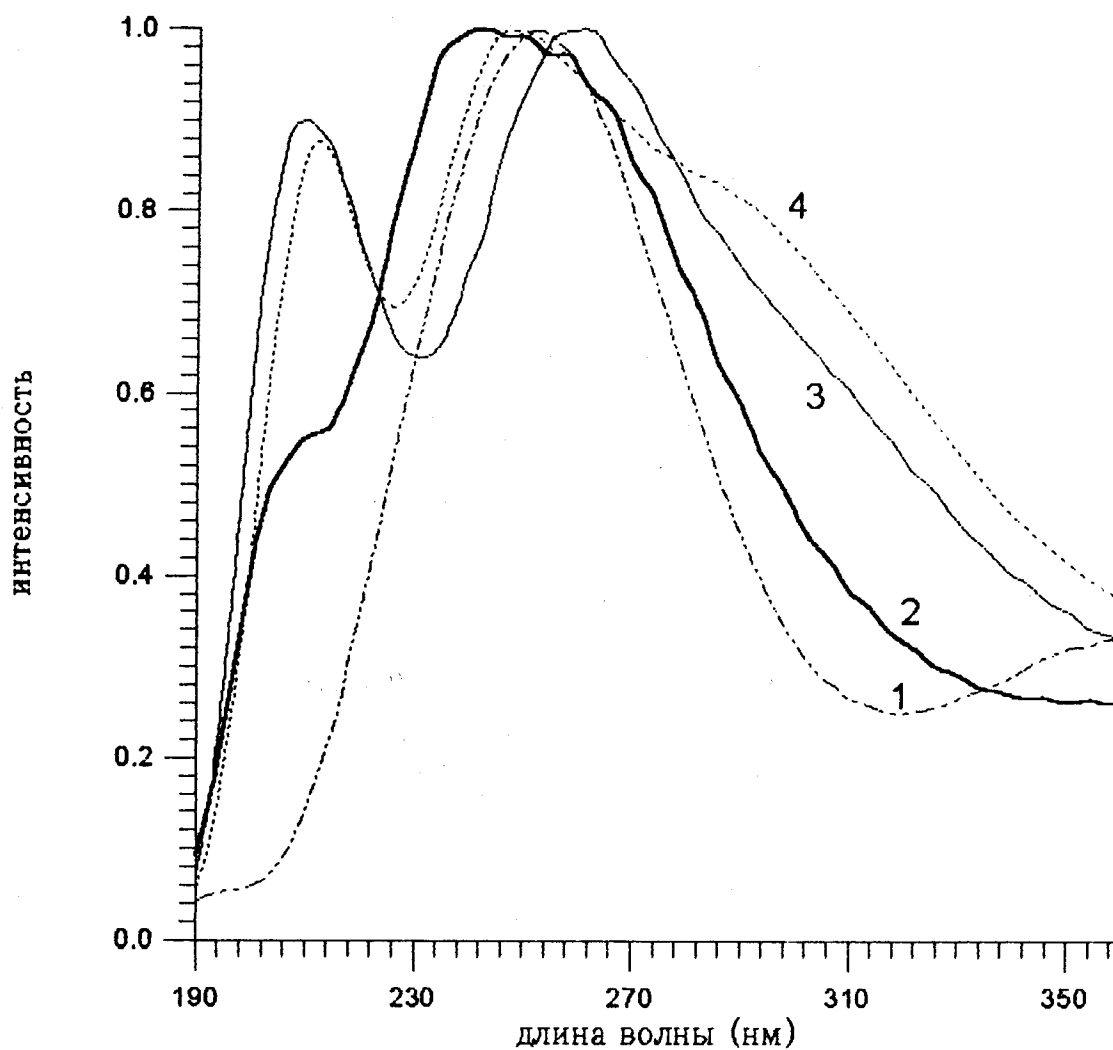


Рис. 2.1. Оптические тракты четырех детекторов хроматографа "Милихром - 4".

2.1. ТЕОРИЯ.

Моделирование искажения спектров, вызываемого реальными спектрофотометрами, проводилось с помощью специально разработанной В.Н. Ассадулиным по нашему алгоритму компьютерной программы, которая позволяет рассчитать влияние спектральной ширины щели и формы оптического тракта на абсорбционный спектр вещества для приборов с линейной дисперсией.

Расчет проводился с учетом следующих допущений: а) гомогенное распределение поглощающего вещества в кювете спектрофотометра; б) соблюдение закона Бугера для истинного спектра (фактически для спектра поглощения вещества, снятого на приборе с узкой щелью); в) отсутствие рассеянного света, а также других химических, фотохимических, температурных, оптических влияний на поглощение.

Оптическая плотность в каждой точке спектра поглощения вещества в выбранном спектральном диапазоне рассчитывалась методом численного интегрирования с использованием 40-100 интервалов в пределах щели по формуле 2.1 [31], справедливой для детекторов, усредняющих по пропусканию:

$$A(\lambda_0) = \lg \frac{\int_{\lambda_0 - \delta/2}^{\lambda_0 + \delta/2} I(\lambda) h(\lambda - \lambda_0) d\lambda}{\int_{\lambda_0 - \delta/2}^{\lambda_0 + \delta/2} I(\lambda) h(\lambda - \lambda_0) 10^{-\epsilon(\lambda) c l} d\lambda} \quad (2.1)$$

где:

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

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

δ - спектральная ширина щели в нм;

λ - текущая длина волны в нанометрах;

$h(\lambda - \lambda_0)$ - 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 включающая интенсивность источника света, потери света на оптических элементах и спектральную чувствительность фотоприемника;

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

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

l - длина оптического пути в сантиметрах.

Исходные функции $h(\lambda - \lambda_0)$, $I(\lambda)$, $\varepsilon(\lambda)$, 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, абсорбционного спектра

вещества и оптического тракта); а также в виде приближений этих функций функцией Гаусса, что позволяет быстро и просто варьировать различные параметры и предпочтительнее при модельных расчетах.

2.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

В работе использовали хромат калия и гидроокись калия квалификации "х.ч." без дополнительной очистки. Использовали также бензол, толуол, нафталин, пирен квалификации "х.ч." для хроматографии, антрацен каменноугольный. Использовали перегнанный метиловый спирт, бидистиллированную воду, перегнанный ацетонитрил.

Спектр поглощения $0,04M$ хромата калия в $0,05N.KOH$ снимали по точкам с интервалом 5 нм относительно растворителя на спектрофотометре "Spekol 20" фирмы "Carl Zeiss" (ГДР) с перезаполнением кюветы. Спектральная ширина щели 15 нм.

Спектр поглощения антрацена ($0,002$ мг/мл в 80% водном метиловом спирте) и растворителя снимали с перезаполнением кюветы на спектрофотометре "Shimadzu 2100" UV-VIS относительно воздуха с последующим вычитанием фоновой линии (спектральная ширина щели $0,2$ нм), а также на детекторе хроматографа "Милихром-4" (ширина щели 5 нм) с приемом данных и усреднением результатов с помощью ЭВМ по программе "Chrom" (автор А.П. Зенков).

Хроматографию тестовой смеси, содержащей бензол, толуол (по 50 мкл на 10 мл ацетонитрила), нафталин ($0,66$ мг/мл), антрацен ($1,02$ мг/мл), пирен ($1,11$ мг/мл) проводили на хроматографе "Милихром А-02" на колонке Eurospher 80-5 C18 в 80% водном метиловом спирте со скоростью 100 мкл/мин.

Хроматографию раствора антрацена (0,04 мг/мл) проводили на хроматографе "Милихром-4" на колонке Lichrosorb 5-C18 длиной 62 мм в 80% водном растворе метилового спирта со скоростью 100 мкл/мин.

Измерение пропускания оптического тракта спектрофотометра "Spekol 20" в диапазоне 322 - 428 нм проводили по точкам с интервалом 1 нм при ширине щели монохроматора 3 нм. Пропускание при 428 нм было принято за 100%, а затем проводили измерения при других длинах волн без изменения коэффициента усиления. Оптический тракт приведен в относительных единицах.

Измерение пропускания оптических трактов хроматографов "Милихром-4" проводили с помощью специальной программы, разработанной Ю.А. Болвановым, и позволяющей оценивать величину тока, пропорциональную интенсивности света, при постоянном напряжении на ФЭУ, при штатной спектральной щели "Милихрома-4" 5 нм.

2.3. КАЧЕСТВЕННОЕ ОПИСАНИЕ.

Для качественной оценки суммарного влияния спектральной щели монохроматора и крутизны оптического тракта на искажение спектра поглощения вещества проведен расчет для следующей модельной системы: истинный спектр вещества - функция Гаусса с максимумом при 375 нм и шириной на полувысоте 20 нм; спектральная щель (аппаратная функция монохроматора) имеет форму равнобедренного треугольника с шириной на полувысоте 10 нм; оптические тракты трех разных типов. На рис.2.2 представлен исходный спектр (кривая а) и просканированные щелью спектры (кривые b, c и d) при оптических трактах, показанных кривыми b', c' и d', со-

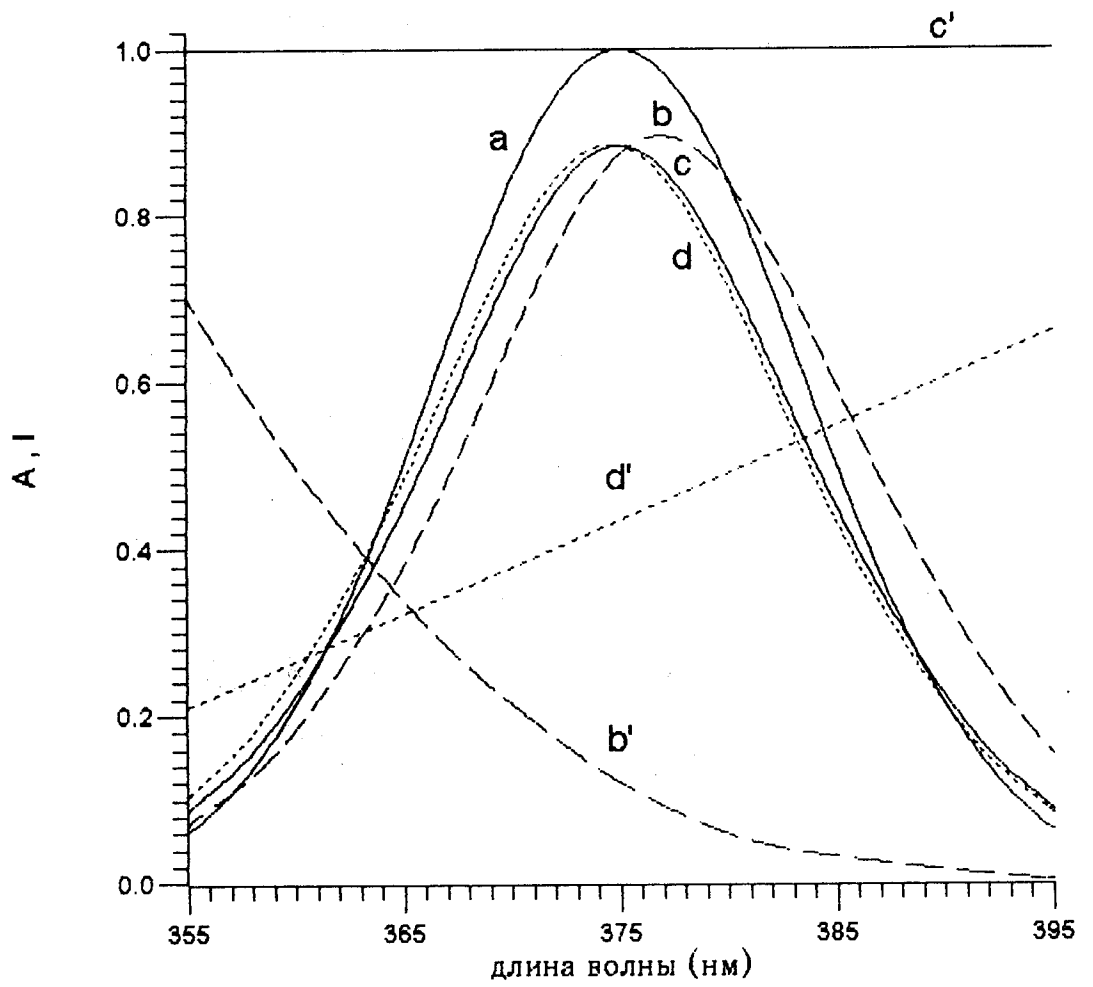


Рис.2.2. Модельные исходный и расчетные спектры поглощения и соответствующие им оптические тракты.
а - исходный спектр, b, c, d - расчетные спектры, b', c', d' - соответствующие им оптические тракты.

ответственно.

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 крыльях спектра с сохранением симметрии и положения максимума (кривая c).

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 (максимум смещен всего на 0,4 нм), хотя из сопоставления спектров c и d видно, что смещение в коротковолновой части больше, чем в длинноволновой; это обусловлено большим относительным изменением тракта в пределах щели в коротковолновой части диапазона по сравнению с длинноволновой.

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 тракта (1,9 нм) и его асимметрия значительно больше, чем у спектра d .

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

Эти представления подтверждают экспериментальные данные, приведенные на рис.2.3, где показан истинный, рассчитанный и

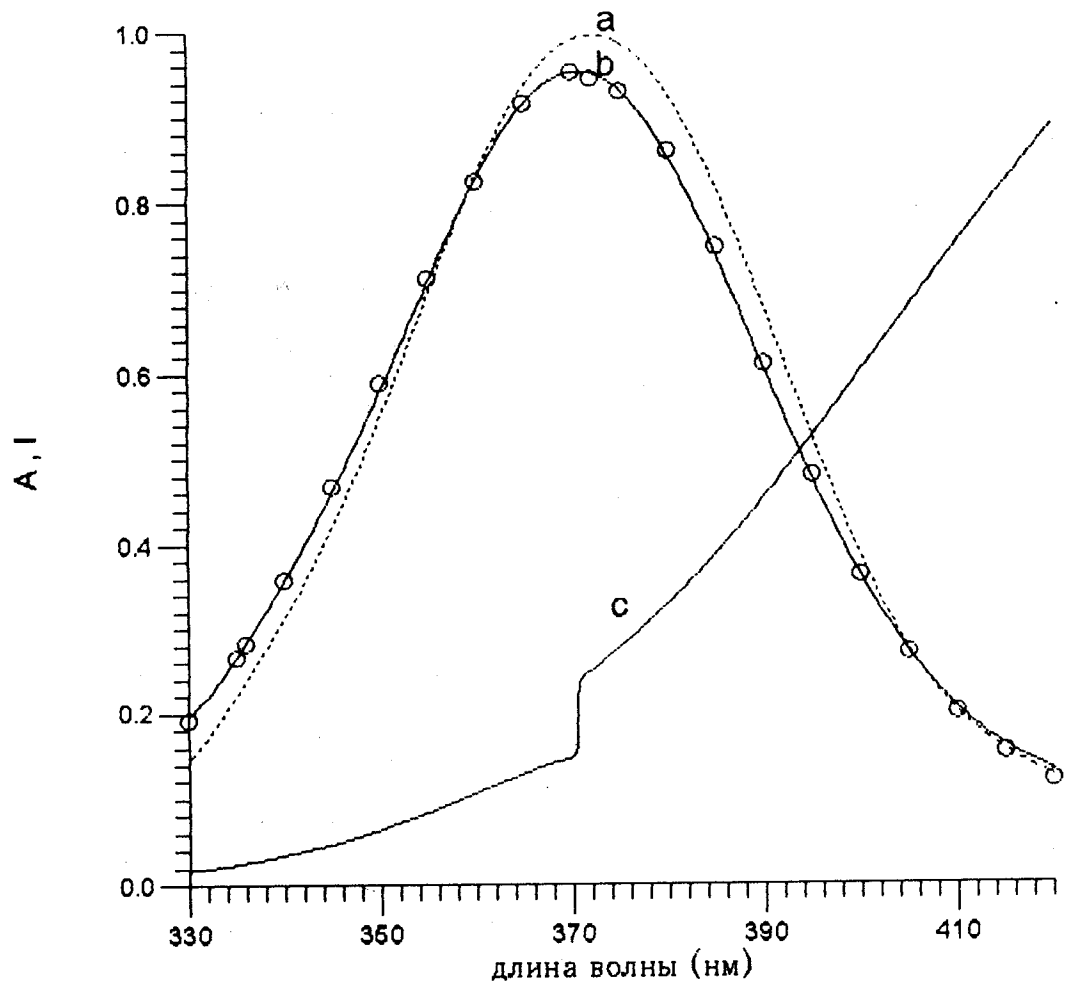


Рис.2.3. Литературный, расчетный и экспериментальный спектры щелочного хромата калия.
а - литературный, б - расчетный, кружки - экспериментальный спектр, в - оптический тракт спектрофотометра Spekol 20.

экспериментальный спектр поглощения хромата калия, а также оптический тракт спектрофотометра "Spekol 20". Резкий излом оптического тракта при 371 нм обусловлен автоматически вводимым в монохроматоре прибора светофильтром для подавления второго порядка дифракции. Расчетный и экспериментальные спектры хромата калия значительно сдвинуты в сторону меньших значений интенсивности света по тракту, причем этот сдвиг сопоставим по величине с эффектом сглаживания за счет щели.

На рис.2.4 представлены аналогичные данные для спектра антрацена, снятого на "Милихроме-4". В этом случае основной причиной искажений спектра является сглаживание щелью, причем, величина искажений неодинакова для правого и левого крыльев спектра, имеющих различную крутизну.

Наблюдается практически полное совпадения расчета и эксперимента.

2.4. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ.

На рис.2.5-2.10 представлены результаты количественной оценки описанных выше эффектов, причем, рис.2.5-2.8 отражают проблемы, связанные с идентификацией веществ по их спектрам, а рис. 2.9, 2.10 акцентируют внимание на проблемах, связанных с законом Бера. Эти рисунки имеют единый набор обозначений.

Все модельные расчеты проводились для трех длин волн симметричного спектра вещества гауссовой формы (кривая а на рис.2.2), выбранных по принципу наибольших различий в характере спектра: для точки спектрального максимума (375 нм) и двух длин волн вблизи точки перегиба, оптическая плотность в которых составляет половину от максимальной (для спектра а на рис.2.2 с ши-

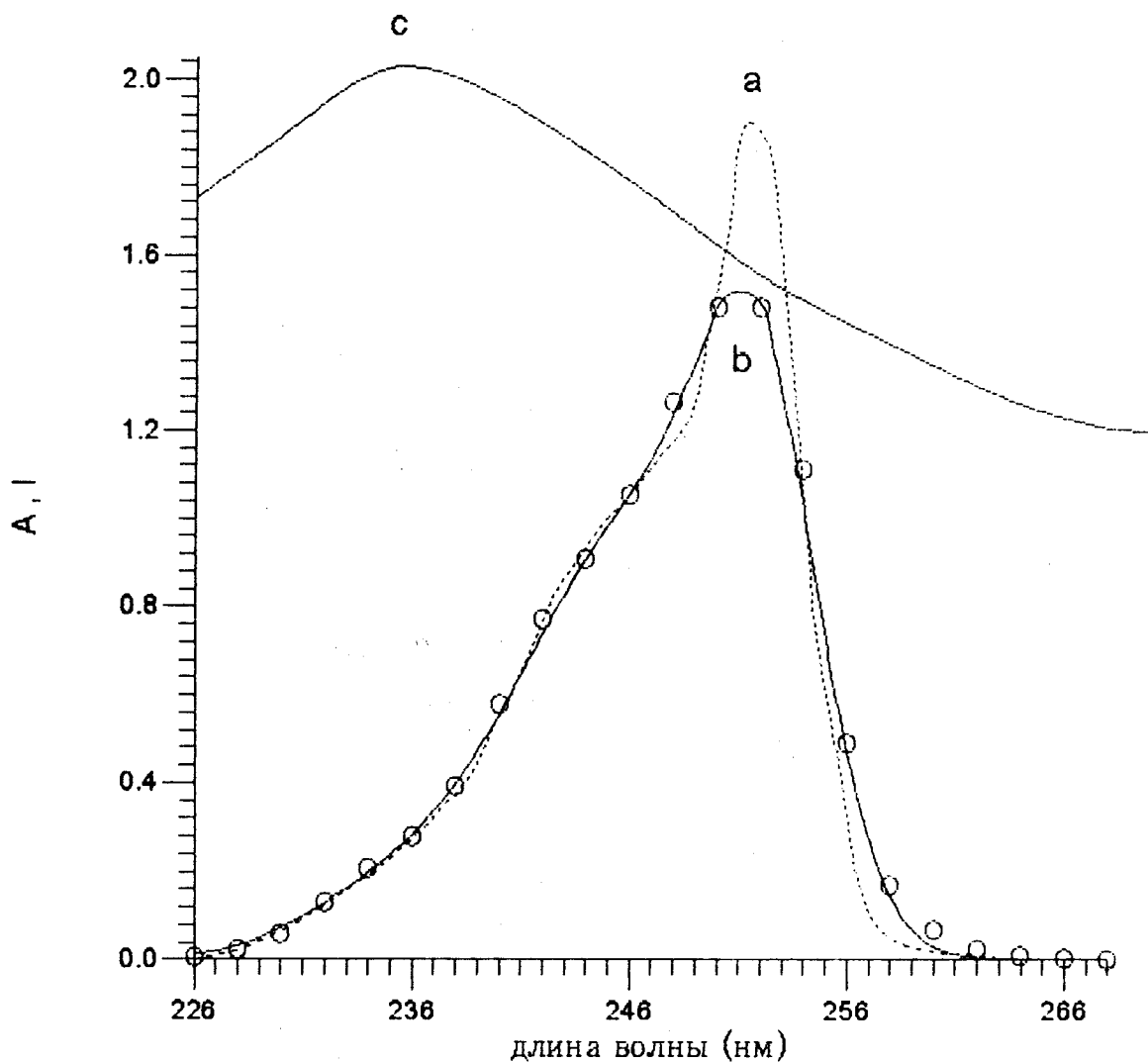


Рис. 2.4. Истинный, расчетный и экспериментальный спектры антрацена.
а - истинный (снятый на "Shimadzu 2100 с шириной щели 0.2 нм),
б - расчетный, кружки - экспериментальный (снятый на "Милихроме -4" с шириной щели 5 нм) спектры, с - оптический тракт " Милихром -4"

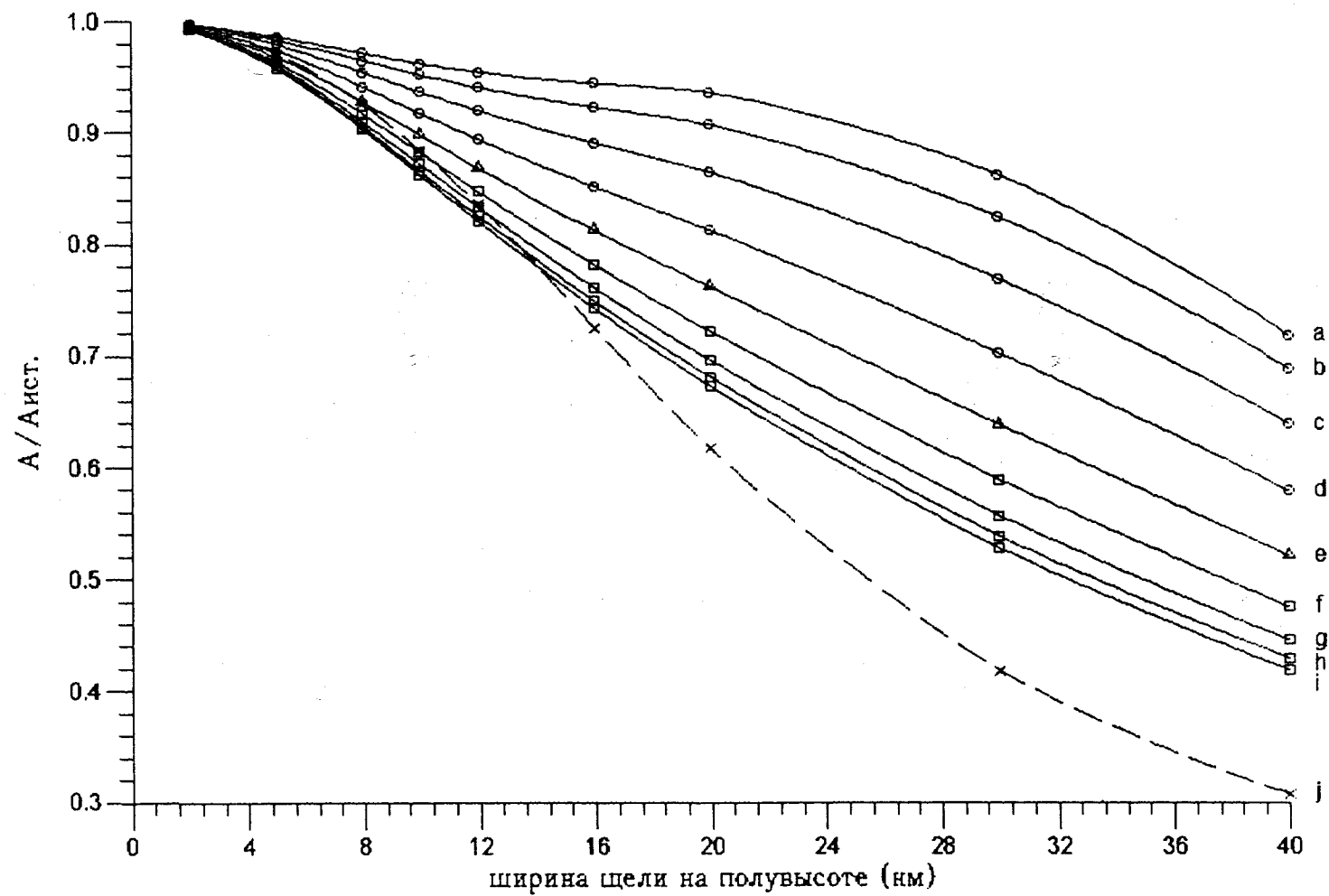


Рис.2.5. Зависимость отношения рассчитанной оптической плотности к истинной от спектральной ширины щели.

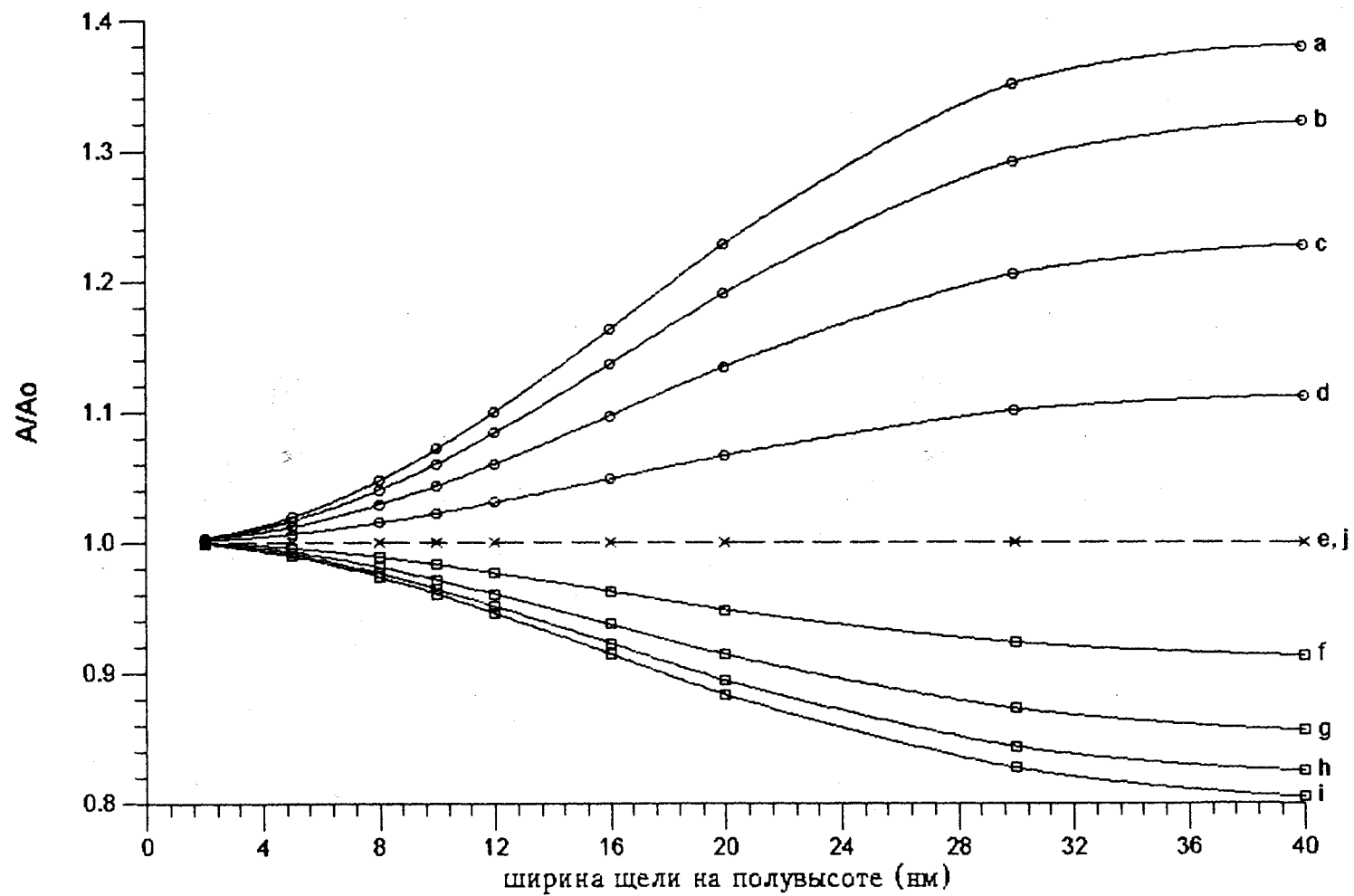


Рис.2.6. Зависимость отношения оптической плотности для наклонных трактов к оптической плотности для тракта с нулевым наклоном от спектральной ширины щели.

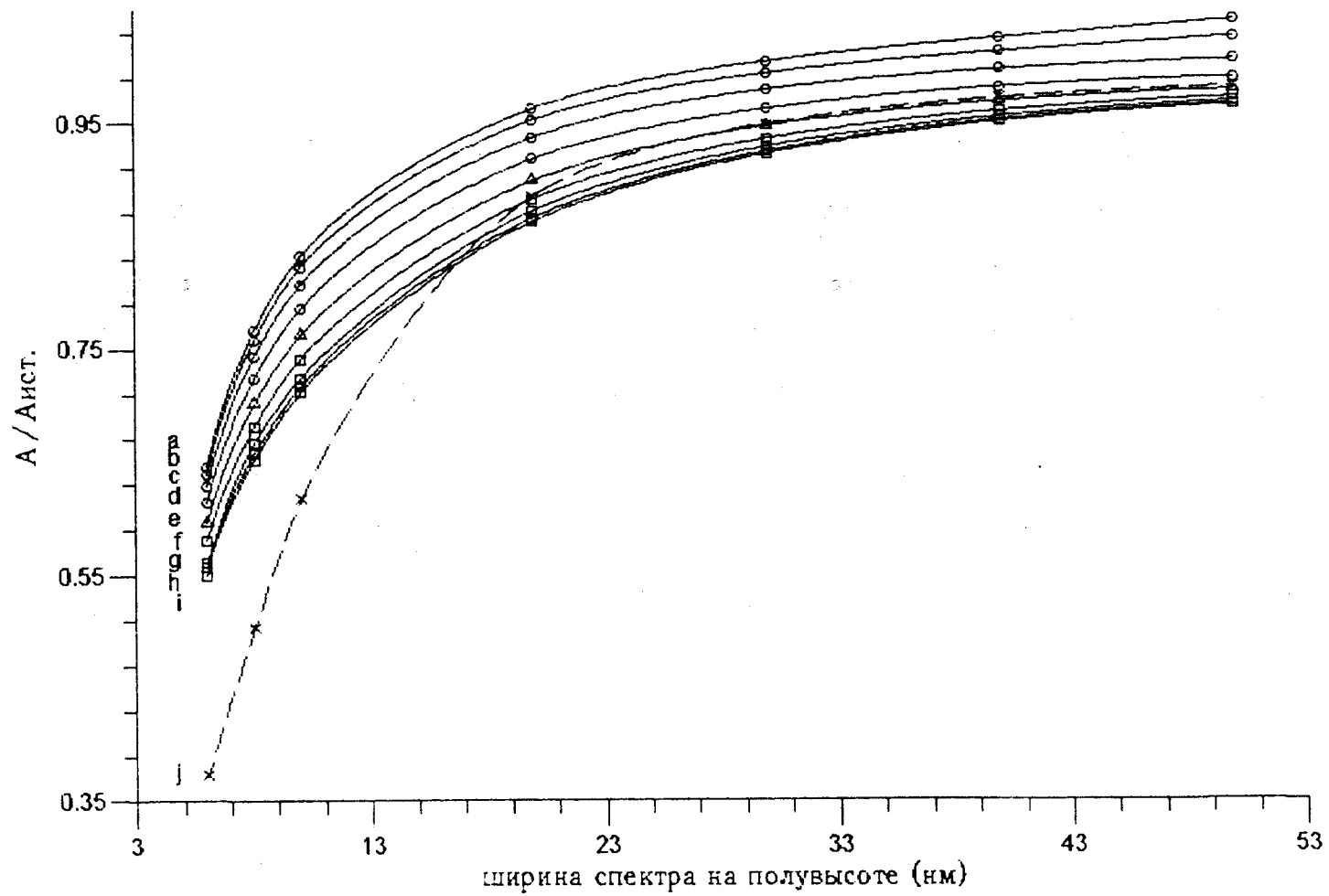


Рис.2.7. Зависимость отношения рассчитанной оптической плотности к истинной от ширины спектра.

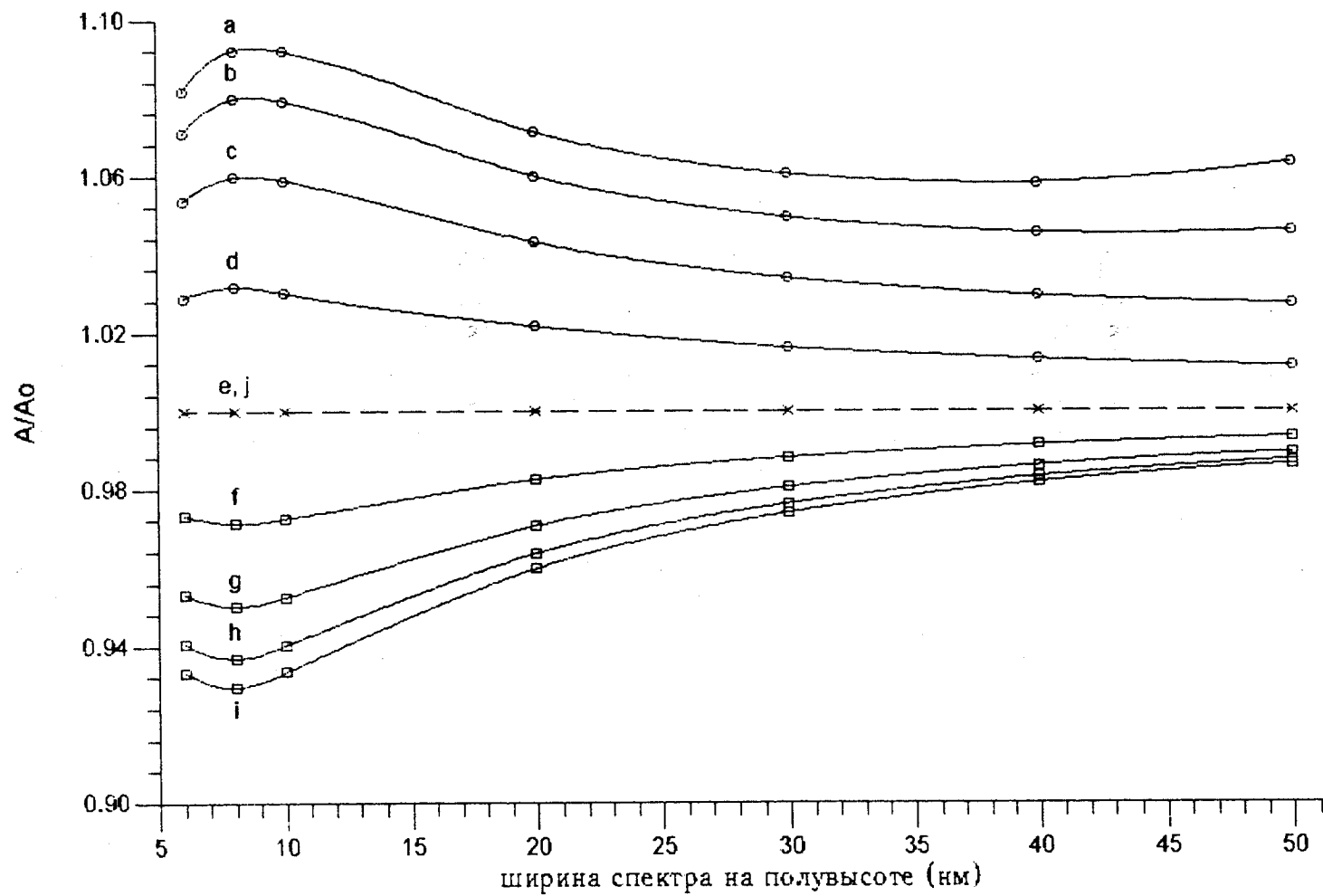


Рис 2.8. Зависимость отношения оптической плотности для наклонных трактов к оптической плотности для тракта с нулевым наклоном.

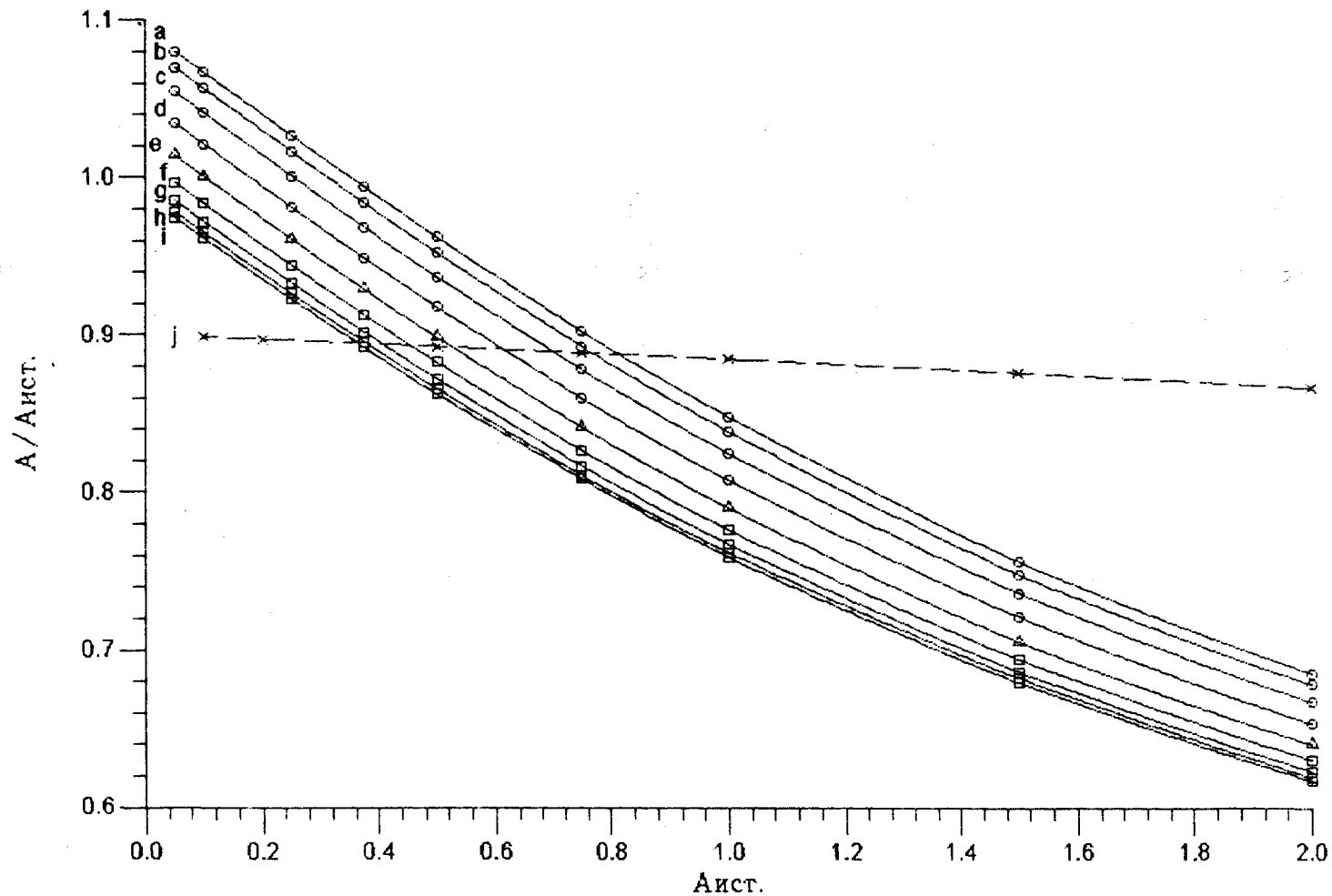


Рис.2.9. Зависимость отношения рассчитанной оптической плотности к истинной от истинной оптической плотности.

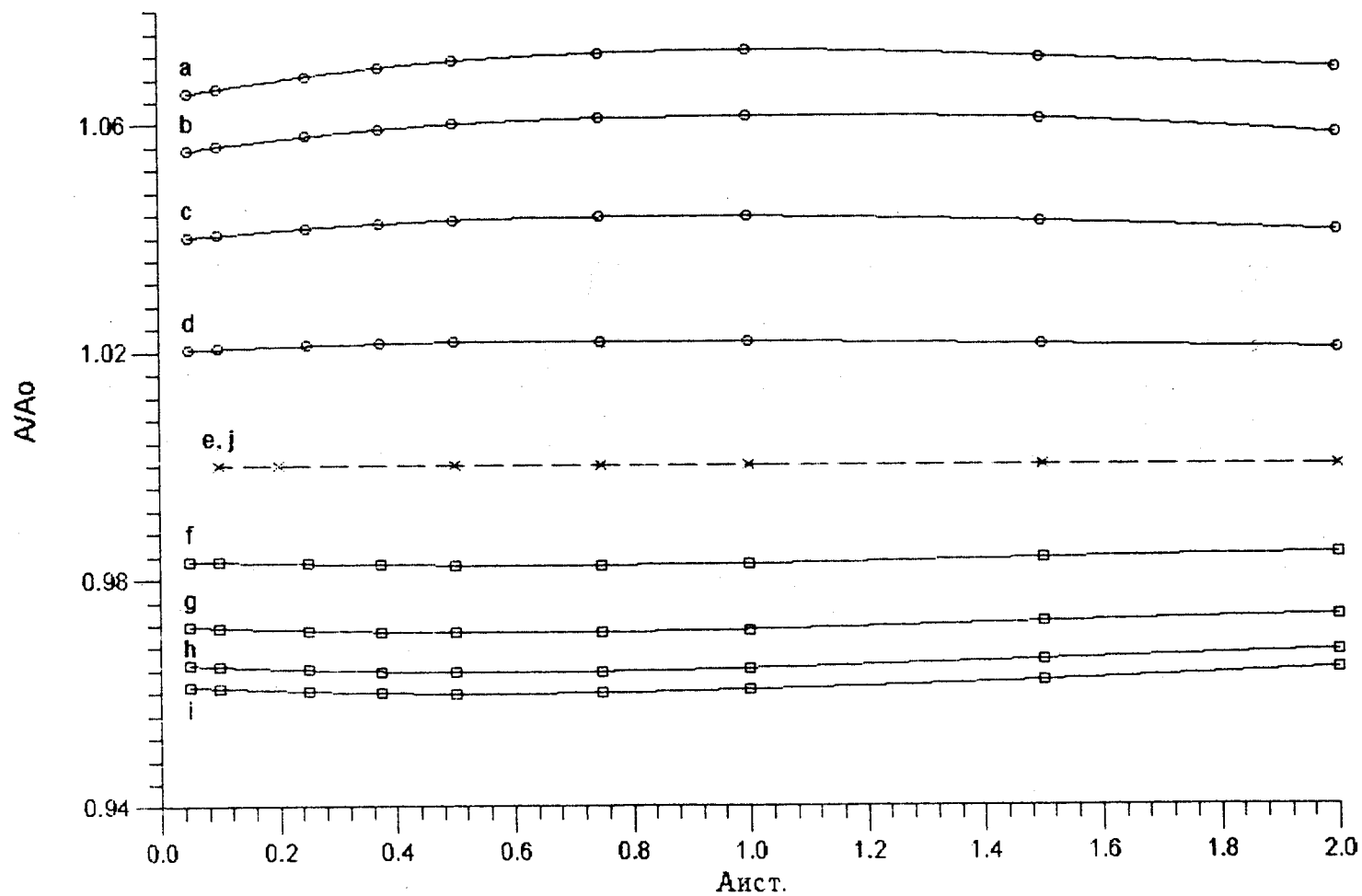


Рис. 2.10. Зависимость отношения оптической плотности для наклонных трактов к оптической плотности для тракта с нулевым наклоном от истинной оптической плотности.

риной на полувысоте 20 нм это соответствует длинам волн 365 и 385 нм, с изменением ширины спектра эти длины волн меняются). На рис.2.5-2.10 кривые *a-d*, обозначенные кружками, соответствуют длинам волн слева от максимума спектра, *f-i*, обозначенные квадратами, - длинам волн справа от него, кривая *j* соответствует спектральному максимуму. Кривая *e*, обозначенная треугольниками, относится к длинам волн, как слева, так и справа от максимума спектра при оптическом тракте с нулевым наклоном (однородное распределение света по тракту, кривая *c'* на рис.2.2).

Оптические тракты моделировались прямыми линиями с пропорционально меняющимися наклонами. Один из трактов с максимальным наклоном показан на рис.2.2, кривая *d'*. Остальные, используемые в расчетах, имеют наклоны меньше, чем у данного тракта, соответственно в 2, 4, 8 раз в спектральном диапазоне 340 - 410 нм. На рис.2.5-2.10 этим трактам по мере убывания наклона соответствуют буквенные обозначения *a-d* и *i-f*. Хотя форма оптического тракта может быть произвольной, модель в виде прямых линий выбрана для облегчения сопоставления результатов расчета, кроме того, на практике в пределах ширины щели форма тракта во многих случаях близка к линейной.

Демонстрационные рисунки приведены для случая достаточно широкой спектральной щели треугольной формы (ширина на полувысоте 10 нм) для наглядного представления обсуждаемых эффектов (кроме рисунков 2.5 и 2.6, где щель меняется).

Рис. 2.5, 2.7, 2.9 иллюстрируют совместное влияние ширины щели и наклона тракта на оптическую плотность. На этих рисунках показано изменение отношения рассчитанной оптической плотности к истинной для трех выбранных длин волн в спектре вещества при

трактах с различными наклонами.

Интересно выделить в чистом виде вклад, непосредственно связанный с оптическим трактом. Это иллюстрируют рис.2.6, 2.8, 2.10, где представлены отношения оптической плотности для наклонных трактов (A) к оптической плотности для тракта с нулевым наклоном (A_0) при одной и той же ширине щели.

Анализ зависимостей на рисунках 2.5 и 2.6 свидетельствует о значительном несимметричном вкладе крутизны оптического тракта в искажение спектра на его склонах: для левого склона спектра изменения больше, чем для правого. Это объясняется большим относительным изменением интенсивности света в пределах щели при меньших значениях светового потока, причем, с увеличением ширины щели вклад оптического тракта в искажение спектра возрастает. В максимуме спектра влияние крутизны практически отсутствует: кривая j соответствует данным для всех без исключения наклонных трактов; в то же время наблюдается более сильная зависимость собственно от ширины щели.

Данные рисунков 2.7 и 2.8 дают дополнительную информацию о сложном характере искажения спектра при наклонных трактах: для левого склона спектра влияние наклона тракта возрастает с увеличением ширины спектра, в то время, как для правого склона это влияние постепенно уменьшается. Все представленные на рис.2.8 кривые имеют неожиданный экстремум при ширине спектра примерно равной ширине щели.

Обобщая результаты, приведенные на рис.2.5- 2.8, можно сделать следующие заключения:

а) влияние ширины щели как таковой сильнее проявляется в максимуме спектра, чем на его крыльях 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 регистрируемой интенсивности света по тракту.

На рис.2.9 представлены концентрационные зависимости в специальных координатах: закон Бугера для истинного спектра на рисунке 2.9 отображается прямой, параллельной оси абсцисс, с единицей по оси ординат. Изменению наклона калибровочной кривой соответствует параллельный сдвиг по оси ординат. Отклонение кривых от параллельности оси абсцисс свидетельствует о нарушении закона Бугера. Для спектрального максимума (кривая j) во всем рабочем диапазоне оптических плотностей не наблюдается зависимости от наклона оптического тракта и имеются лишь небольшие отклонения от закона Бугера (кривая почти параллельна оси абсцисс), в то время, как для длин волн на склонах спектра отклонения от линейности значительны и наблюдается четко выраженная зависимость от наклона оптического тракта. Кривые $a-i$ практически параллельны друг другу, это свидетельствует о том, что калибровочные кривые зависимости оптической плотности от концентрации для разных оптических трактов отличаются только коэффициентом.

Рис.2.10 выделяет вклад, вносимый оптическим трактом, в

отклонение от линейности и в изменение наклона калибровочных кривых. Приведенные данные показывают, что небольшой вклад в отклонение калибровочных кривых от линейности крутизна оптического тракта все же может вносить и это необходимо учитывать там, где требуется особая точность. В остальных случаях отклонения от линейности можно рассчитывать с достаточной степенью надежности, используя алгоритмы для случая постоянной интенсивности света по тракту, описанные ранее во многих работах.

Подобные представленным на рис. 2.9-2.10 зависимости для тех же самых спектра вещества и спектральной щели были получены также и для нелинейных оптических трактов в виде гауссовых функций с максимумами, сдвинутыми относительно максимума спектра поглощения на 5 и 25 нм, и с шириной на полувысоте 40 нм.

Обобщение данных для нелинейных трактов, а также представленных на рис. 2.9 и 2.10, приводит к следующим заключениям:

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

б) 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.

2.5. ПРИМЕНЕНИЕ В ХРОМАТОГРАФИИ.

При хроматографии во многих случаях первостепенным является вопрос о гомогенности хроматографического пика. Рассмотренные

выше эффекты могут приводить к тому, что действительно гомогенный пик не отвечает требованию постоянства спектральных характеристик, например, абсорбционных отношений по пику (отношение поглощения при одной длине волны к поглощению при другой). Это иллюстрирует рисунок 2.11, где показан гипотетический гомогенный хроматографический пик и два абсорбционных отношения по пику, рассчитанные для спектра d на рис.2.2. Это подтверждают также расчеты Стьюарта [21], показавшего, что используемые в хроматографии детекторы имеют значительные нелинейности данного типа даже при низких оптических плотностях, если спектральная щель достаточно широка по отношению к ширине полосы спектра вещества.

При анализе сложных смесей не всегда уделяется должное внимание оптимальному выбору длин волн для регистрации каждого компонента пробы, что может привести к значительным ошибкам в их определении и неправильной трактовке результатов. На рис. 2.12 представлены две хроматограммы одной и той же смеси полиароматических углеводов, отличающихся только объемом пробы (для нижней хроматограммы он в 10 раз больше, чем для верхней). Обращает внимание аномальное уширение и непропорциональное уменьшение высоты при сохранении симметрии для пятого пика, соответствующего антрацену, по сравнению с другими. Это аномальное поведение одного вещества из смеси не может быть объяснено причинами, связанными с колонкой, а также влиянием рассеянного света. На рис.2.13 представлены калибровочные зависимости для высоты и площади пика антрацена и суммы площадей оставшихся за вычетом антрацена пронумерованных компонентов смеси. Последняя калибровочная зависимость является прямолинейной. Наблюдается неодинаковый характер калибровочных кривых для высоты и площади пика

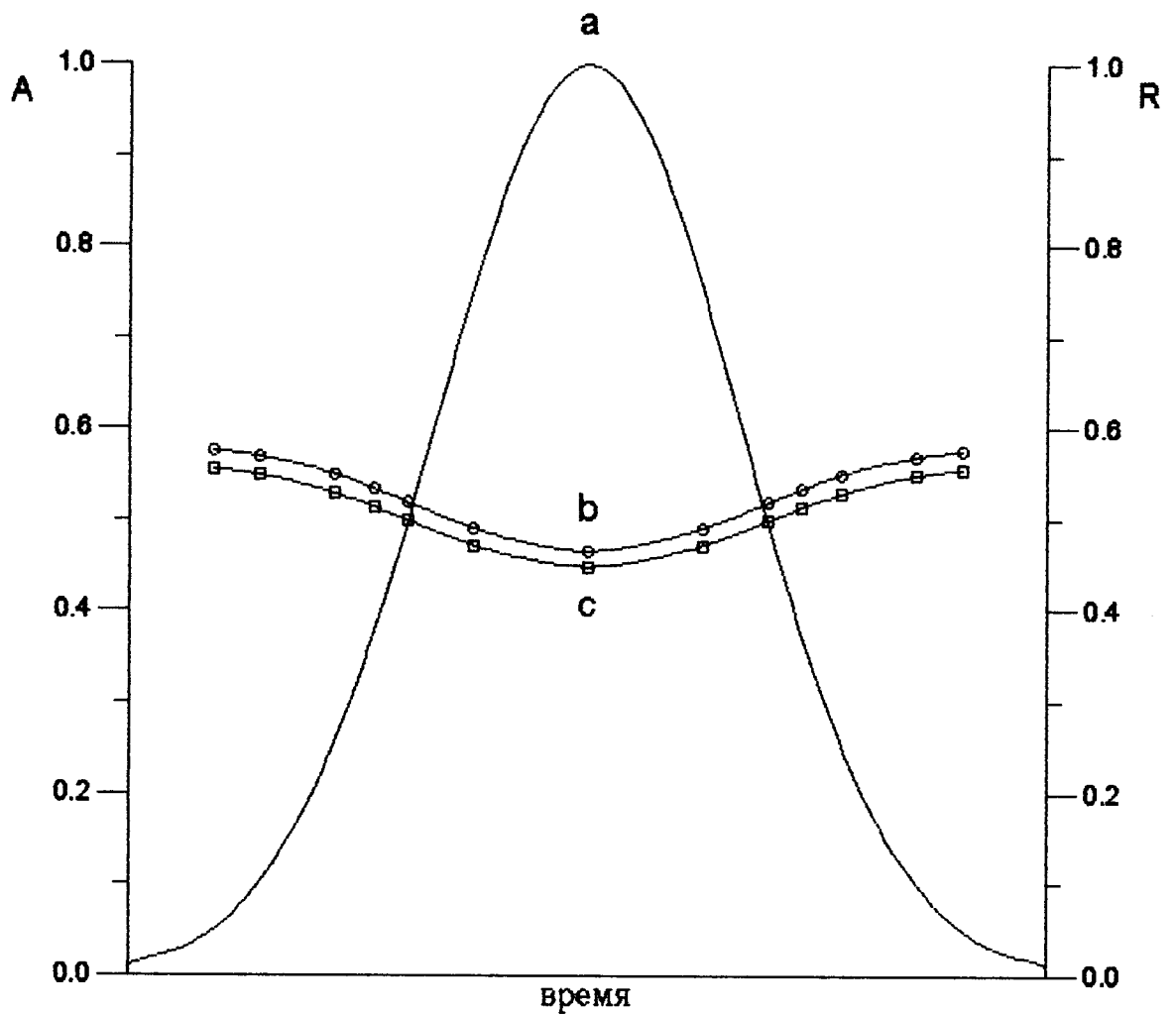


Рис. 2.11. Модельные абсорбционные отношения для гипотетического хроматографического пика чистого вещества. Спектр чистого вещества показан кривой d на рис.22. На данном рис.: а-гипотетический хроматографический пик, б-абсорбционные отношения $A(365\text{нм})/A(375\text{нм})$, с- $A(385\text{нм})/A(375\text{нм})$.

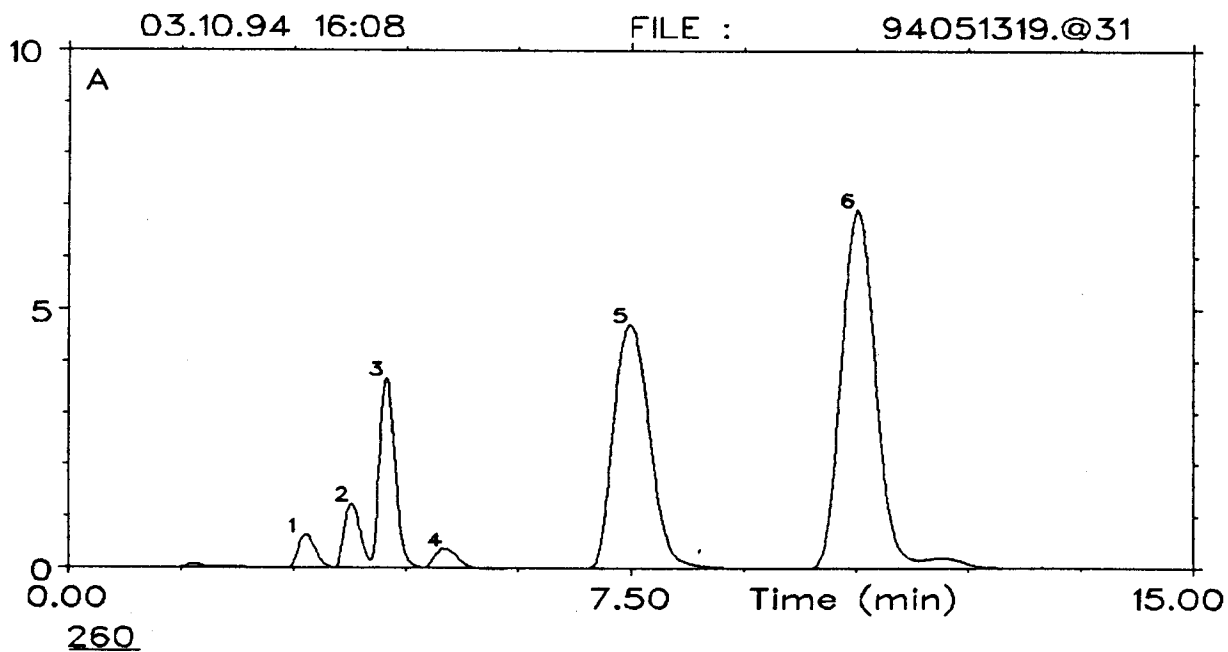
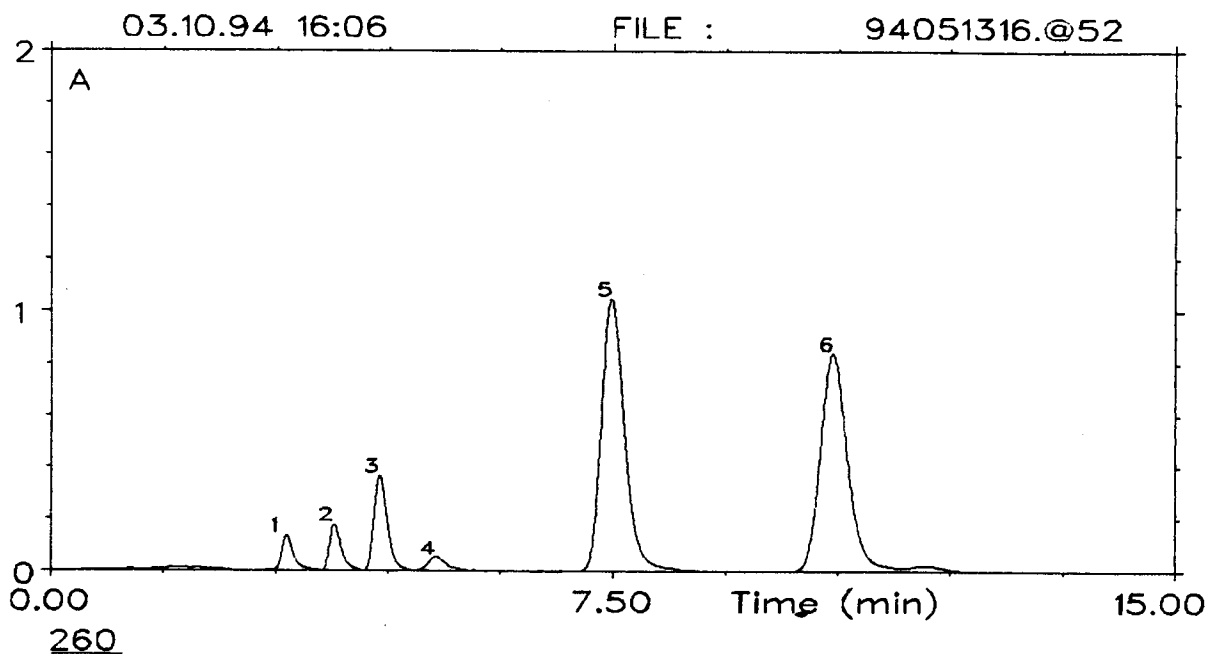


Рисунок 2.12. Хроматограммы смеси полициклических ароматических углеводородов.

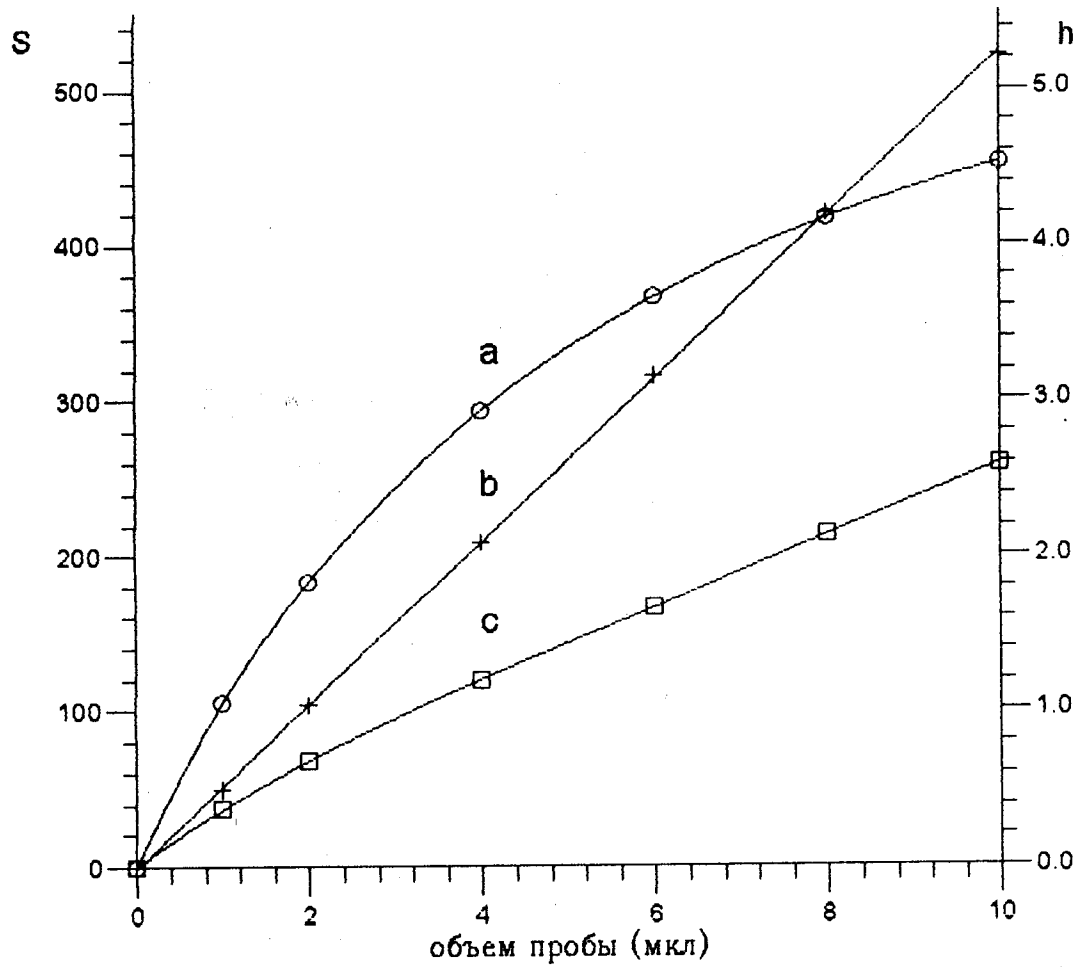


Рис.2.13. Калибровочные кривые для антрацена и остальных компонентов смеси полиароматических углеводородов. Кривая а - для высоты пика антрацена, с - для его площади, б - для суммы площадей оставшихся компонентов смеси. Высота пиков приведена в оптических единицах (о.е.), площадь - в м.о.е. х мл.

антрацена: площадь пика растет почти линейно, в то время, как калибровочная зависимость для высоты пика характеризуется значительной кривизной.

Подобный характер таких зависимостей был сначала теоретически рассчитан Карром [21], а затем экспериментально подтвержден МакДовелом с сотрудниками [22] на примере бифенила, как результат влияния недостатка монохроматичности света за счет спектральной щели и сильной крутизны спектра вещества при выбранной длине волны. Они показали, что относительное изменение в площади пика менее чувствительно к отклонениям от линейности, чем изменение высоты пика, т.к. площадь продолжает увеличиваться за счет постоянного уширения пика с увеличением количества вещества.

На рис.2.14 и 2.15 показаны два разных способа представления концентрационных зависимостей для спектра антрацена, позволяющие сделать аналогичные заключения о причинах его аномального поведения. На рис.2.14 представлены нормированные на оптическую плотность в максимуме истинного спектра спектры поглощения антрацена, рассчитанные для двух концентраций (с оптической плотностью в максимуме истинного спектра 0,1 и 3) и спектральной ширины щели 5 нм. Тракт, использованный при расчете, приведен на рис. 2.4. При таком способе представления несовпадение расчетных спектров для разных концентраций указывает на отклонения от закона Бера, а степень несовпадения при каждой длине волны характеризует величину этого отклонения. Такой способ представления позволяет оценить выполнимость закона Бера сразу для всего спектра. Рис.2.14 наглядно демонстрирует практическое отсутствие нарушения закона Бера для левого крыла спектра и постепенное

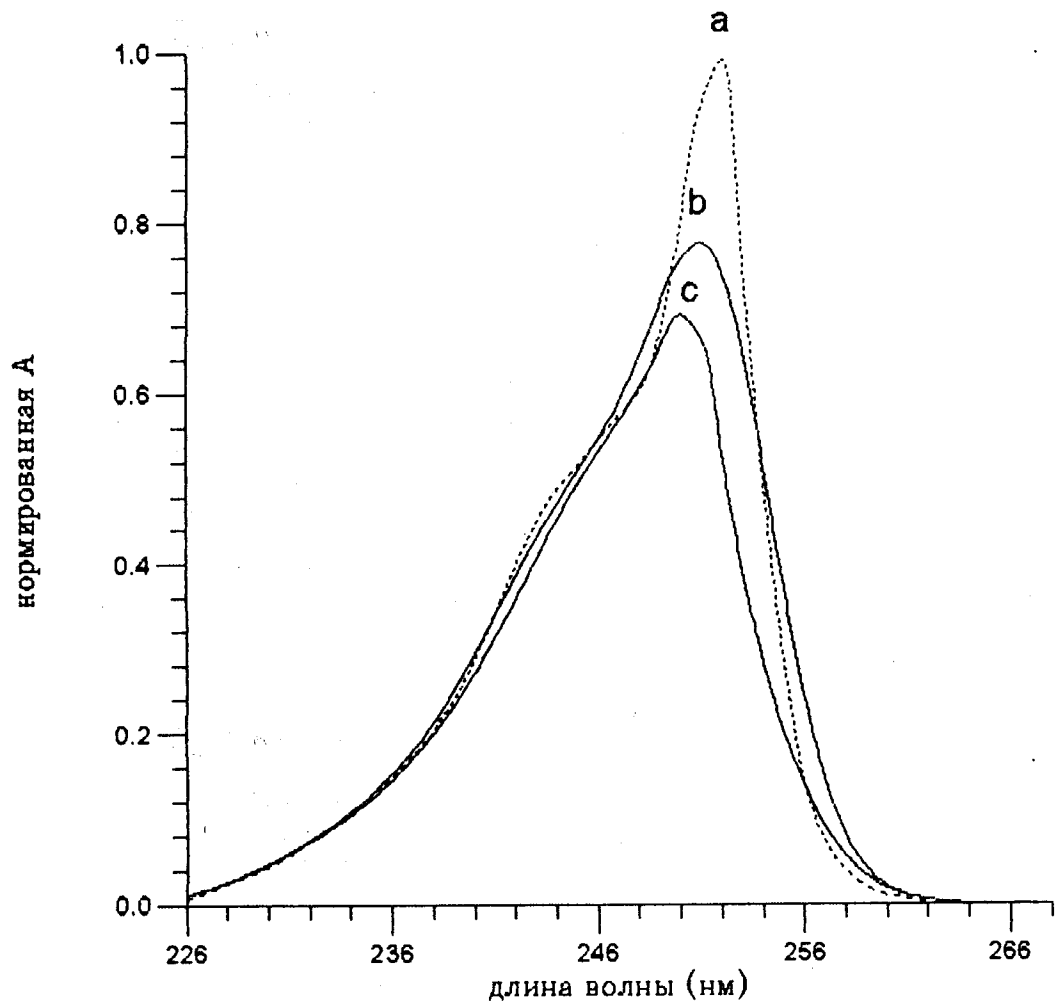


Рис.2.14 . Расчетные спектры поглощения антрацена для двух различных концентраций.
а - истинный спектр поглощения антрацена, б - нормированный на максимум истинного спектра расчетный спектр для 0.1 о.е. в максимуме истинного спектра, с - аналогичный нормированный расчетный спектр для 3 о.е. в максимуме истинного спектра.

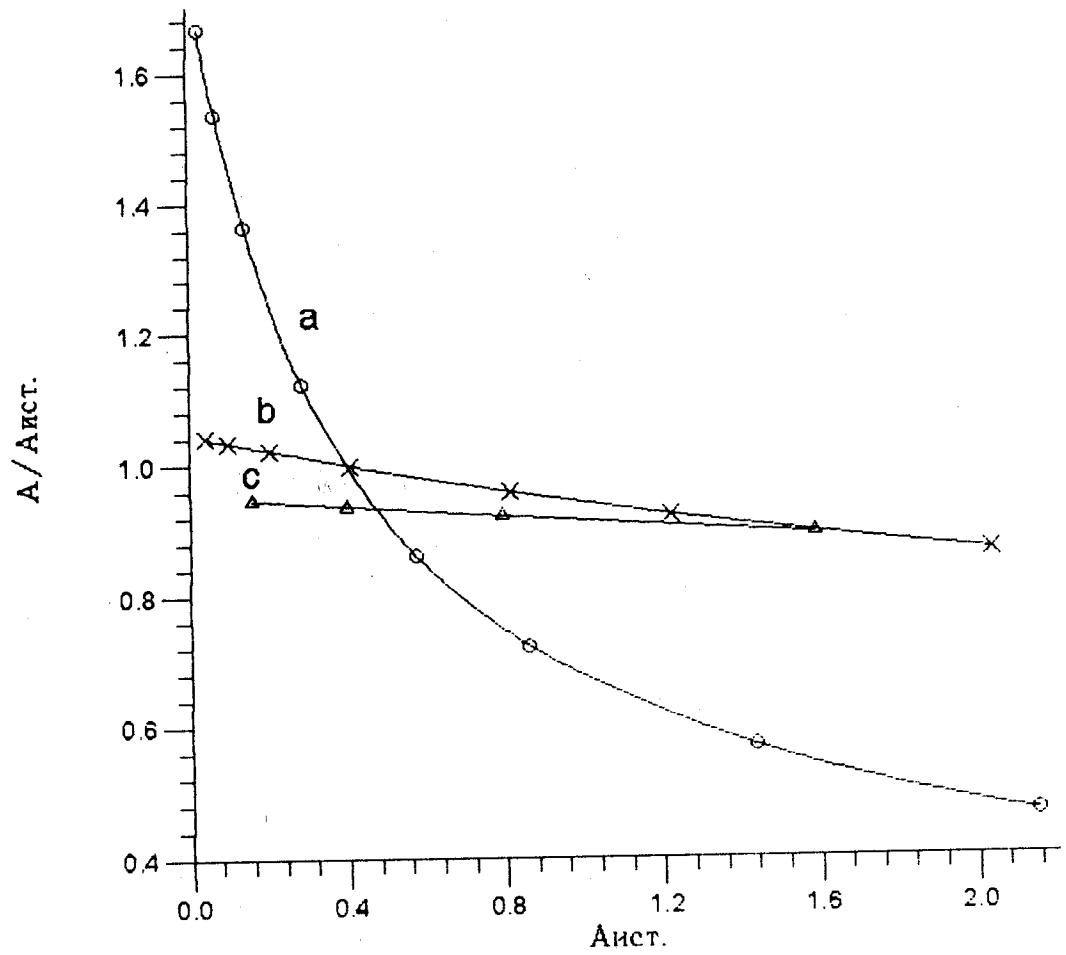


Рис. 2.15. Зависимость отношения рассчитанной оптической плотности к истинной от истинной для антрацена. а - соответствует длине волны 256 нм, б - 238 нм, в - 250 нм.

увеличение величины относительных отклонений для правого крыла. Очевидно, что при невозможности регистрировать антрацен в максимуме спектра предпочтение должно быть отдано коротким длинам волн.

Способ представления данных на рис.2.15 аналогичен рис.2.9. Расчет проведен для трех длин волн: одной вблизи максимума и двух на склонах спектра. Приведенные зависимости свидетельствуют о небольших сходного характера отклонениях от закона Бера для длин волн 238 нм и 250 нм и значительных отклонениях для 256 нм. Реконструкция модельного хроматографического пика с учетом этих отклонений при 256 нм приведет к его кажущемуся уширению без нарушения симметрии, аналогично представленным на рис.2.12 данным для антрацена.

Результаты расчета отклонений от линейности, представленные на рис.2.15, позволяют моделировать изменение абсорбционных отношений по пику антрацена для выбранных длин волн. Эти данные приведены на рис.2.16 (расчет проведен для длины оптического пути 0,15 см). Абсорбционные отношения $A(238\text{нм})/A(250\text{нм})$ стабильны по пику, а $A(256\text{нм})/A(250\text{нм})$ имеют четко выраженный симметричный минимум, как и следует ожидать из всей предыдущей логики расчетов и заключений. На рис.2.17 приведены результаты эксперимента, подтверждающие расчет. Для демонстрации воспроизводимости эффектов представлены две повторные хроматограммы антрацена, полученные на хроматографе "Милихром-4" (неинформативная часть хроматограмм отрезана). Условия специально подобраны так, чтобы избежать влияния градиентов концентрации в кювете, описанных в следующей главе.

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует слож-

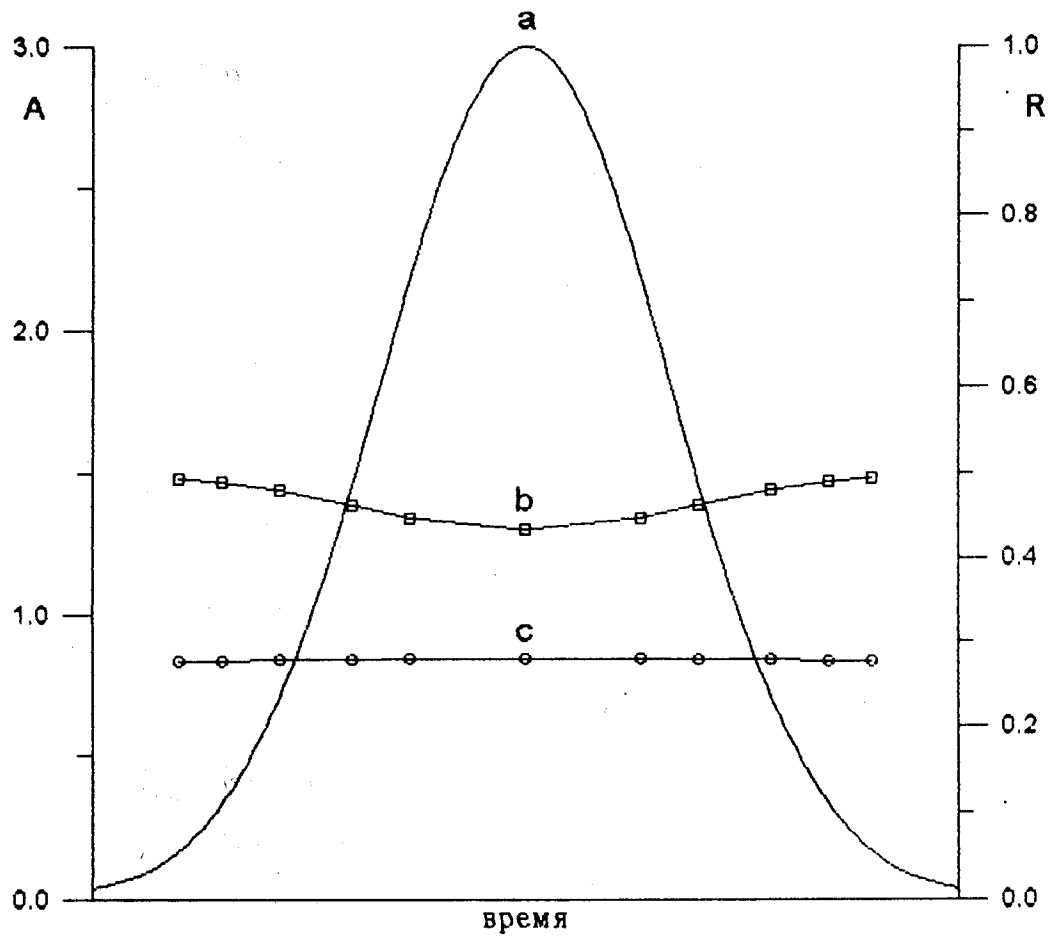


Рис.2.16. Модельные абсорбционные отношения для хроматографического пика антрацена. а - хроматографический пик, б - абсорбционное отношение $A(256 \text{ нм}/250 \text{ нм})$, с - $A(238 \text{ нм}/250 \text{ нм})$.

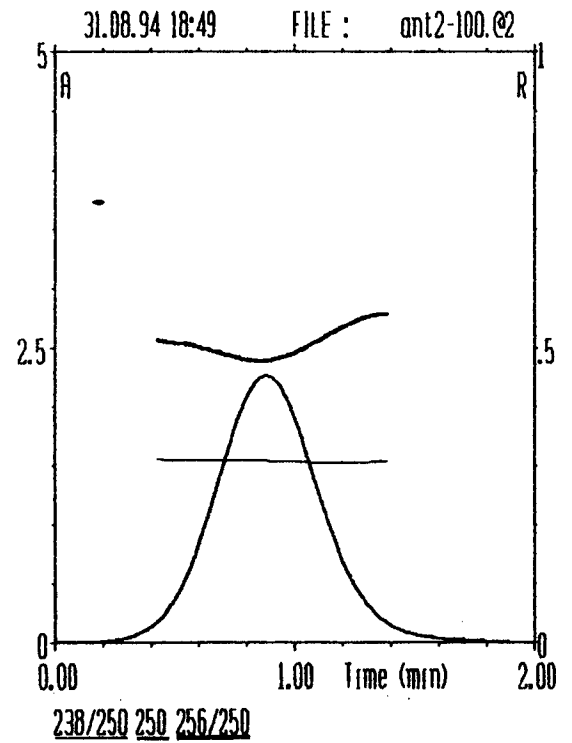
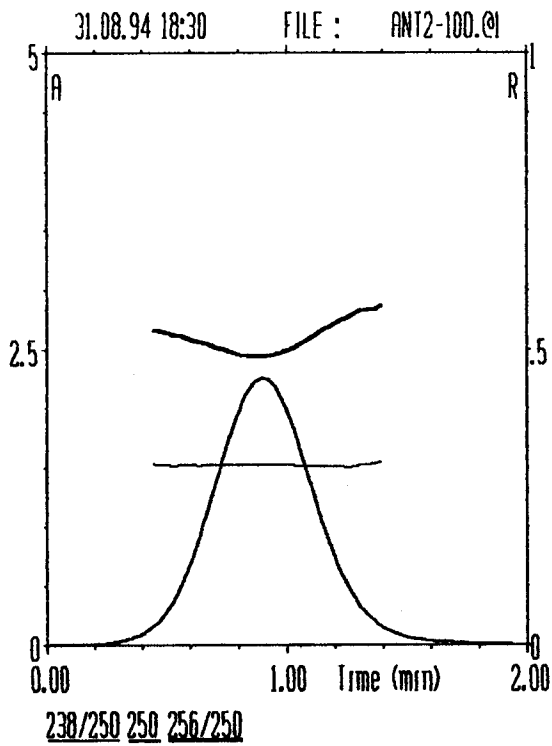


Рис. 2.17. Экспериментальные абсорбционные отношения для хроматографического пика антрацена. Все кривые аналогичны представленным на рис. 2.16.

ный, а иногда и труднопредсказуемый характер влияния спектральной щели и оптического тракта на форму хроматографического пика, калибровочные зависимости, стабильность абсорбционных отношений по пику. Однако четкое представление о существующей проблеме позволяет моделировать и учитывать отклонения в каждом конкретном случае, либо просто обходить возникающие трудности. Точное представление о характере влияния ширины щели детектора и характеристик оптического тракта на искажение спектра вещества и отклонения от закона Бера можно получить, проведя соответствующие расчеты, однако при качественной оценке можно пользоваться обобщающими выводами на стр. 64, 65, 66.

Руководствуясь этими выводами, можно дать следующие рекомендации для практики хроматографического анализа:

1. При идентификации веществ прямое сопоставление литературных и экспериментальных спектральных данных возможно только, если отношение ширины полосы спектра к ширине щели > 10 , в остальных случаях может происходить значительное несимметричное искажение спектров. Особенно это относится к спектрам, снятым на краях спектрального диапазона детектора.

2. При проверке гомогенности и чистоты хроматографических пиков, а также при разложении плохо поделенных пиков, для гарантированного сохранения неизменности спектральных характеристик (например, абсорбционных отношений) для чистого компонента необходимо во-первых, выбирать длину волны для регистрации компонента в максимуме спектра, а при невозможности этого избегать наиболее крутых участков спектра; и во-вторых, работать при возможно более низких оптических плотностях, особенно при небольших отношениях ширины спектра к ширине щели.

ГЛАВА 3.

ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОЙ ШИРИНЫ ЩЕЛИ И ГРАДИЕНТА КОНЦЕНТРАЦИИ В КЮВЕТЕ НА ОЦЕНКУ ГОМОГЕННОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПИКА.

В предыдущей главе были рассмотрены проблемы, связанные с широкой спектральной щелью детектора, а также с формой спектра поглощения вещества, при однородном распределении вещества в кювете. Показано, что в этом случае можно ожидать симметричных искажений абсорбционных отношений по ходу хроматографического пика чистого вещества с появлением экстремума.

Приведенные в главе 1.3 литературные данные свидетельствуют о том, что к настоящему времени нет каких - либо значительных исследований по учету неоднородности распределения вещества в площади спектральной щели, вызванной изменением концентрации вещества при прохождении пробы через кювету детектора, и влиянию этой неоднородности на оценку гомогенности хроматографического пика чистого вещества. Объясняется это разнообразным характером и крайней сложностью описания происходящих в кювете процессов. В связи с этим представляют интерес любые, даже самые простые модели, помогающие продвижению вперед в этом направлении.

В этой главе влияние спектральной щели будет рассмотрено комплексно с учетом неоднородного распределения поглощающего вещества в кювете детектора.

В настоящее время типичной кюветой для хроматографического детектора является конусная ячейка с "Z"-образными подводами. Такая конструкция позволяет минимизировать застойные зоны и уменьшить размывание пика, однако появляются новые проблемы,

связанные со сложно зависимым от времени перемешиванием пробы в кювете.

При типичных скоростях потока 30-200 мкл/мин в штатной кювете "Милихрома-4" с "Z"-образными подводами также возможно появление сложных градиентов концентрации, зависящих от случайных факторов, которые при определенных условиях могут приводить к непредсказуемым изменениям абсорбционных отношений по пику чистого вещества. То, что такие факты имеют место, демонстрирует рисунок 3.1, где показаны абсорбционные отношения для хроматографических пиков полиароматических углеводородов, снятые в штатной кювете "Милихрома-4". Рисунок наглядно показывает, что для узких хроматографических пиков, выходящих на высокоэффективной колонке в начале хроматограммы (нафталин, антрацен, пирен), абсорбционные отношения значительно сильнее отличаются от идеальной горизонтальной прямой, чем для широкого пика бенз(а)пирена с большим временем удерживания, имеющего при подходе к кювете более пологий градиент концентрации.

Точное моделирование влияния концентрационных градиентов на измеряемую оптическую плотность с учетом спектральной ширины щели является довольно сложной задачей. Поэтому для подтверждения присутствия и выяснения характера такого влияния мы ограничимся рассмотрением простой модели заданного градиента концентрации, легко воспроизводимого в экспериментальных условиях.

Моделировалась функция распределения концентрации поглощающего вещества в пределах светового зонда по мере прохождения хроматографического пика гауссовой формы для кюветы хроматографа "Милихром-4" цилиндрической формы с длиной оптического пути 1.5 мм объемом 2 мкл с прямыми подводящими капиллярами.

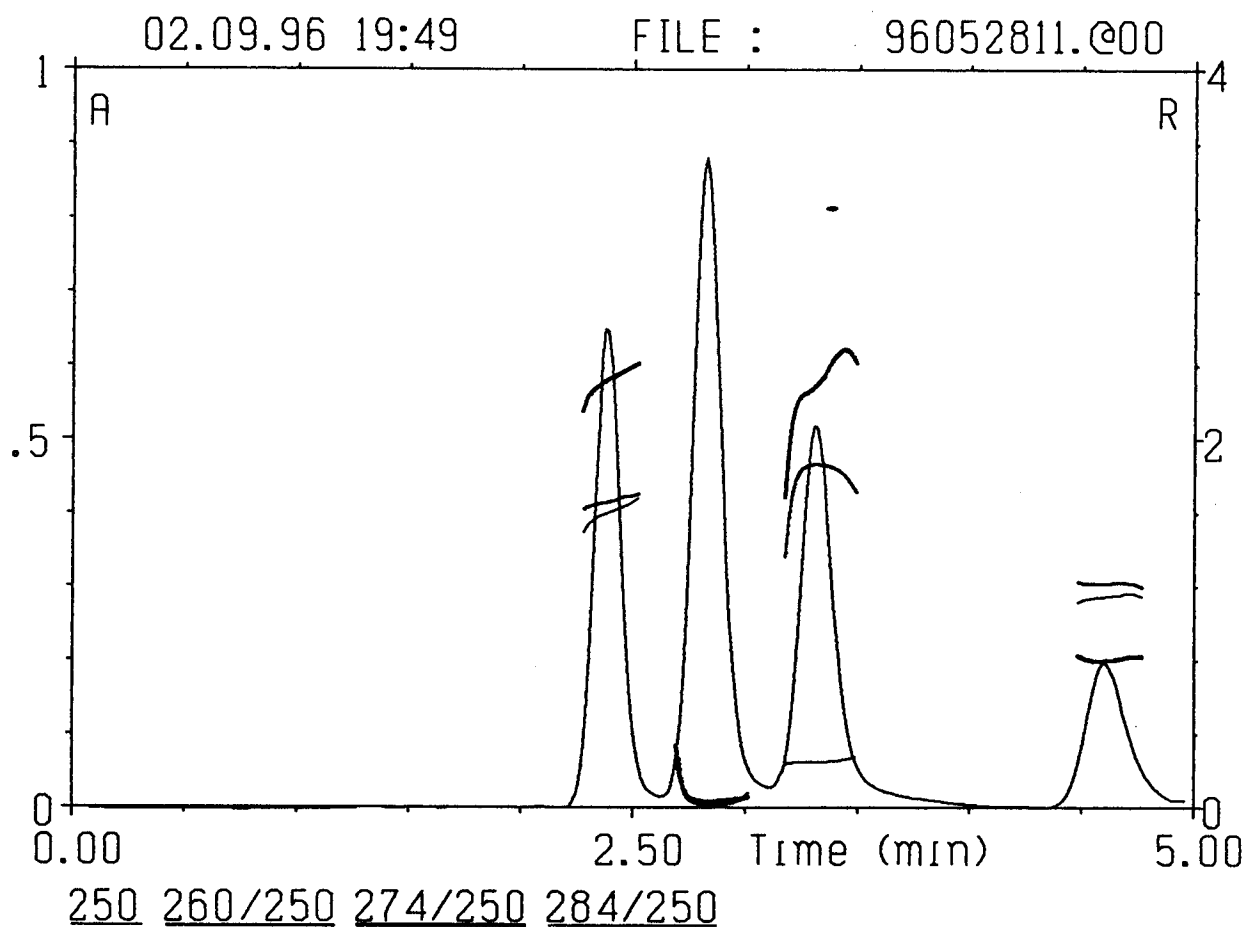


Рис.3.1. Абсорбционные отношения для хроматографических пиков полиароматических углеводородов (нафталина, антрацена, пирена и бенз(а)пирена).

При этом были приняты следующие допущения:

- а) направление светового потока параллельно оси цилиндра кюветы;
- б) направление движения потока пробы перпендикулярно направлению светового потока;
- в) площадь светового зонда совпадает с поперечным сечением кюветы;
- г) проекция направления движения потока пробы на плоскость поперечного сечения кюветы параллельна оси абсцисс и противоположна направлению развертки по длинам волн внутри спектральной щели. Назовем это прямым вводом пробы;
- д) проекция концентрационного градиента пробы на ту же плоскость в каждый момент времени прохождения хроматографического пика совпадает с распределением концентрации в части пика, заключенной в данный момент в кювете, т.е. принимается гипотеза о том, что в кювете не происходит размывания пробы, и ее концентрационный профиль практически повторяет профиль проходящего через кювету пика.

Вышеперечисленные условия наглядно иллюстрирует рис.3.2, где на верхних трех рисунках изображено поперечное сечение кюветы (и одновременно светового зонда) со схематическим распределением концентрации пробы в кювете в начале хроматографического пика, в его середине и в конце, а также показана аппаратная функция спектральной щели детектора "Милихрома-4". В нижней части рисунка изображен хроматографический пик с соответствующими трем верхним рисункам функциями распределения концентрации (жирные линии) в пределах объема кюветы. Стрелки указывают направление потока пробы.

Предложенная модель распределения концентрационного гради-

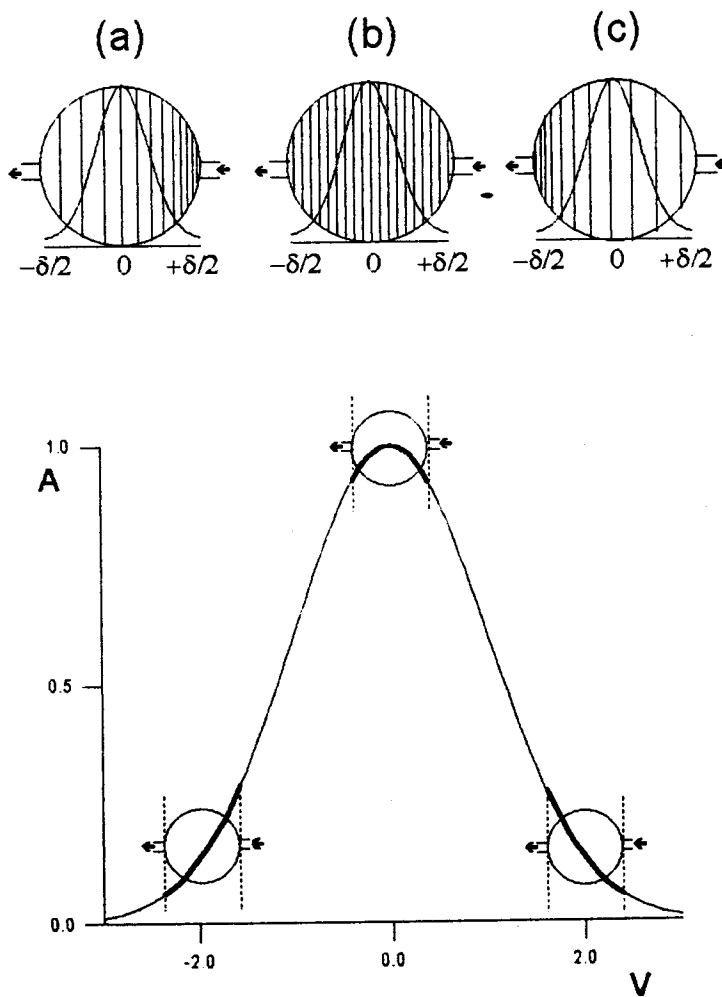


Рис.3.2. Пояснение к модели.

В верхней части рисунка - поперечное сечение кюветы и светового зонда. Штриховка разной плотности схематически иллюстрирует распределение концентрации пробы в кювете в начале (а), середине (в) и в конце (с) хроматографического пика. Наложенной на сечение кюветы кривой гауссовой формы со шкалой длин волн изображена аппаратная функция детектора (δ -спектральная ширина щели).

В нижней части рисунка показан хроматографический пик с условной шкалой текущего объема, а также сечение кюветы с функциями распределения концентрации (жирная линия), соответствующими трем верхним рисункам.

ента пробы в кювете (и в световом зонде) по ходу хроматографического пика описывается функцией двух переменных: координаты, отражающей прохождение в каждый момент времени через центр кюветы определенного объема хроматографического пика, V , и текущей координаты x по оси абсцисс в границах поперечного сечения кюветы. Полагая, что в первом приближении каждому значению координаты x соответствует определенная длина волны в пределах спектральной щели, произведем замену x на λ :

$$C(\lambda - \lambda_0, V) = \exp\{-1/2 * [V + 3K * (\lambda - \lambda_0) / (\delta/2)]^2\} \quad (3.1),$$

где: $C(\lambda - \lambda_0, V)$ - функция распределения концентрации вещества в поперечном сечении кюветы (в долях от единицы) в момент прохождения через центр кюветы объема пика V ;

V - проходящий через центр кюветы объем хроматографического пика (в относительных единицах, кратных стандартному отклонению гауссовой функции), меняется от -3 до $+3$, эти пределы соответствуют концентрации 1% от максимальной;

λ_0 - установленная по монохроматору длина волны (нм);

λ - текущая длина волны при интегрировании в пределах спектральной щели (нм);

δ - спектральная ширина щели (нм);

Величина $(\lambda - \lambda_0) / (\delta/2)$ является мерой относительного расстояния внутри интервала от $-\delta/2$ до $+\delta/2$ одновременно в границах аппаратной функции детектора и в поперечном сечении кюветы;

K - отношение объема кюветы к объему хроматографического пика. В расчетах использовали $K=0,02$. Коэффициент K задает крутизну градиента концентрации: с уменьшением K уменьшается доля

объема пика, находящегося в данный момент в кювете, и относительная крутизна градиента в кювете уменьшается. Сомножитель ЗК соответствует половине объема кюветы в условных единицах объема пика (равного 6 условным единицам), этот сомножитель задает границы заключенной в кювете части хроматографического пика.

Расчет изменения абсорбционных отношений по ходу модельного хроматографического пика гауссовой формы проводили с использованием специальной программы для математических и научно-технических расчетов "Eureka" на персональном компьютере IBM PC.

В качестве модельного спектра была выбрана длинноволновая полоса в спектре поглощения уридина, которая для упрощения расчетов представлялась гауссовой функцией. Литературный (сплошная линия) и модельный (прерывистая линия) спектры уридина в воде приведены на рис.3.3. Штрихами обозначены длины волн, для которых рассчитывались абсорбционные отношения к поглощению при 260 нм.

При расчете учитывали изменение относительной интенсивности света с длиной волны по оптическому тракту. Оптический тракт в интересующем интервале длин волн для конкретного "Милихрома-4", на котором проводилась дальнейшая экспериментальная проверка расчетов, также моделировали гауссовой функцией, что иллюстрирует рис.3.4. (сплошной линией обозначен реальный тракт, прерывистой - модельный).

Аппаратная функция "Милихрома-4", описывающая спектральную щель, также моделировалась гауссовой функцией. На рис.3.5. показаны изображения спектральной щели для четырех оптико-механических блоков "Милихрома-4", полученные спектральным сканированием узкой линии монохроматического света (шириной 10^{-3} нм) с длиной

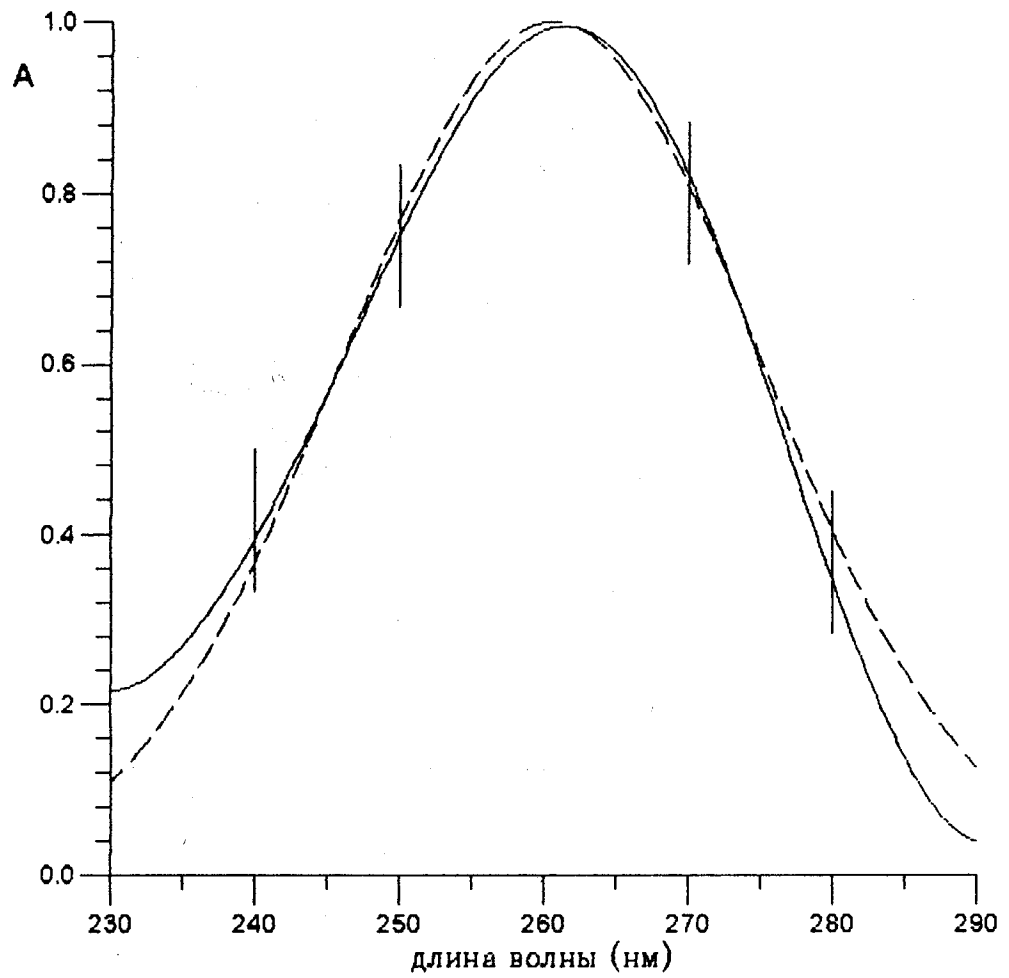


Рис.3.3. Литературный и модельный спектры поглощения уридина
Литературный - сплошная линия, модельный - прерывистая.
Штрихами обозначены длины волн, для которых рассчитывались
абсорбционные отношения к поглощению при 260 нм.

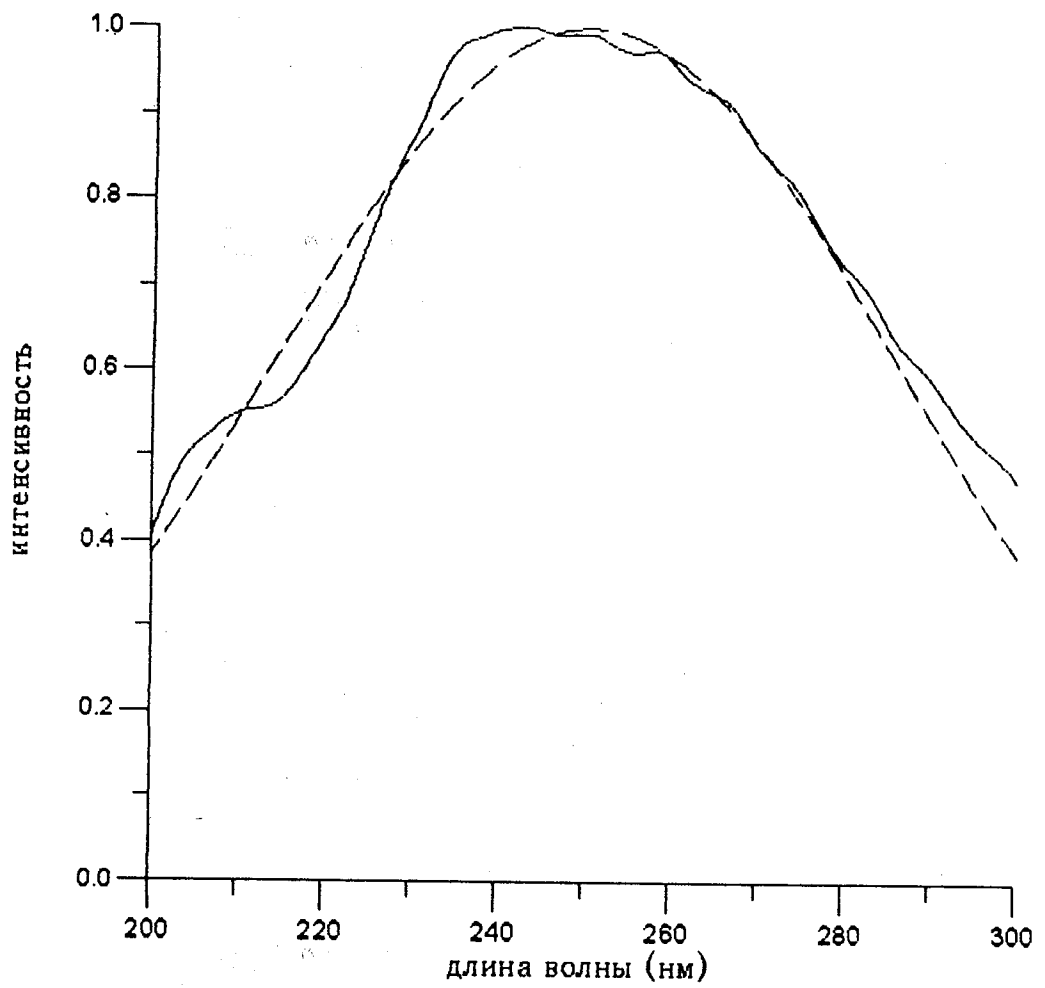


Рис.3.4. Реальный и модельный оптические тракты хроматографа "Милихром - 4".
Реальный - сплошная линия, модельный - прерывистая.

волны 253,7 нм ртутной лампы ДРГС-12 с регистрацией фототока при постоянном напряжении на ФЭУ. В расчетах использовалась щель с шириной на полувысоте 5 нм.

Расчет оптической плотности A для каждой длины волны спектра λ_0 и проходящего через центр кюветы объема V проводили по формуле:

$$A(\lambda_0, V) = \lg \frac{\int_{\lambda_0 - \delta/2}^{\lambda_0 + \delta/2} I(\lambda) h(\lambda - \lambda_0) d\lambda}{\int_{\lambda_0 - \delta/2}^{\lambda_0 + \delta/2} I(\lambda) h(\lambda - \lambda_0) 10^{-\varepsilon(\lambda)C(\lambda - \lambda_0, V)l} d\lambda}, \text{ где}$$

$h(\lambda - \lambda_0)$ - аппаратная функция;

$I(\lambda)$ - спектр оптического тракта (подробнее см. предыдущий раздел);

$\varepsilon(\lambda)$ - спектр вещества, снятый на приборе с узкой спектральной щелью (около 0,1 нм), в единицах, согласованных с концентрацией. В расчете использовали спектр с оптической плотностью в максимуме 2,5;

l - длина оптического пути (см).

Остальные обозначения приведены ранее.

Результаты расчета представлены на рис.3.6. Кривой (а) показан хроматографический пик уридина на длине волны 260 нм, остальные кривые представляют изменение абсорбционных отношений по ходу пика. Рисунок наглядно демонстрирует, что для ситуации, показанной на рис.3.2, когда направление развертки по длинам волн противоположно направлению движения пробы, абсорбционные отношения для длин волн слева от максимума спектра (240нм, 250нм)

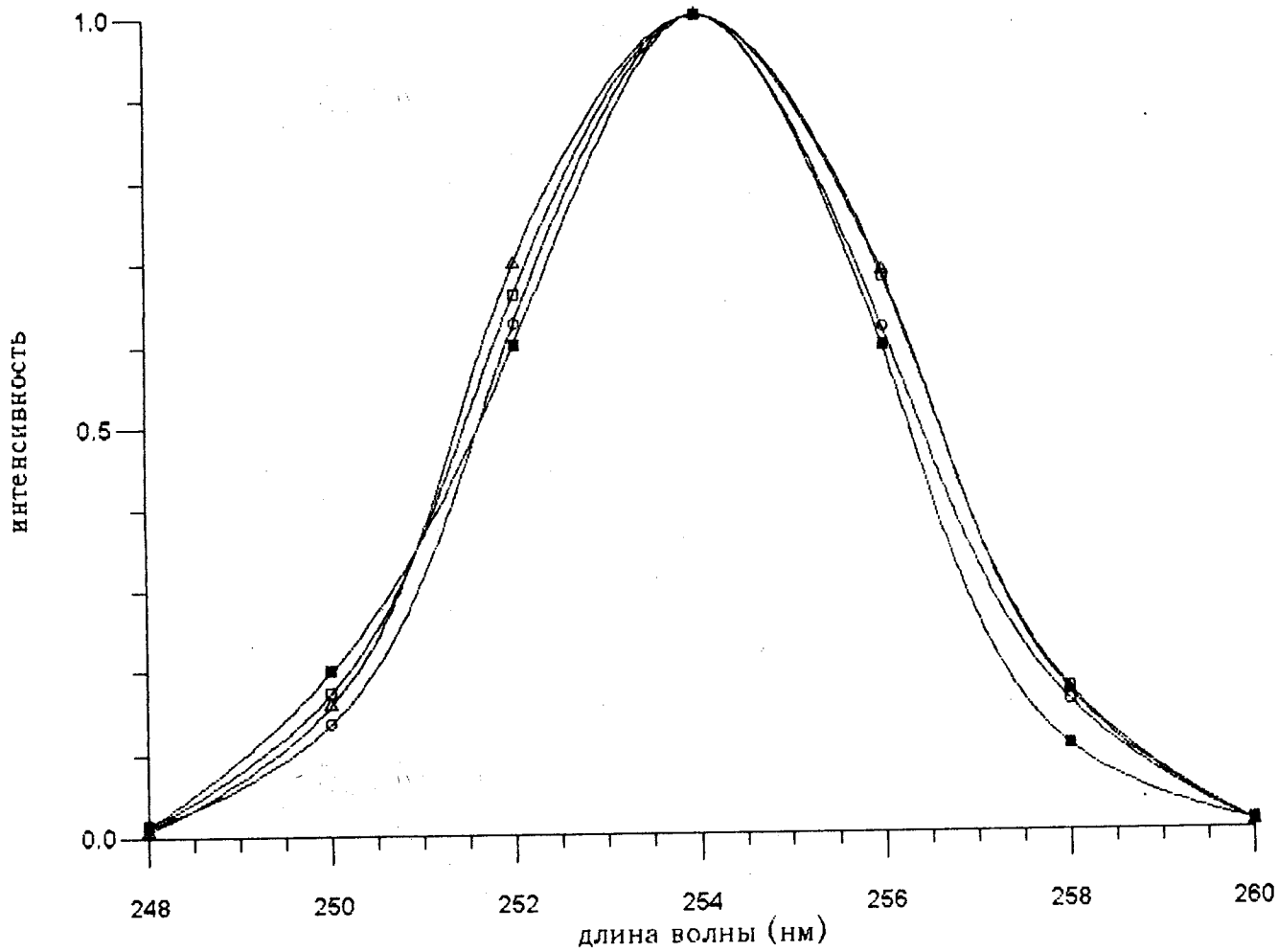


Рис. 3.5. Изображения аппаратной функции спектральной щели "Миллихрома - 4".
Представлены изображения аппаратных функций для четырех оптико - механических блоков, имеющие свой набор обозначений.

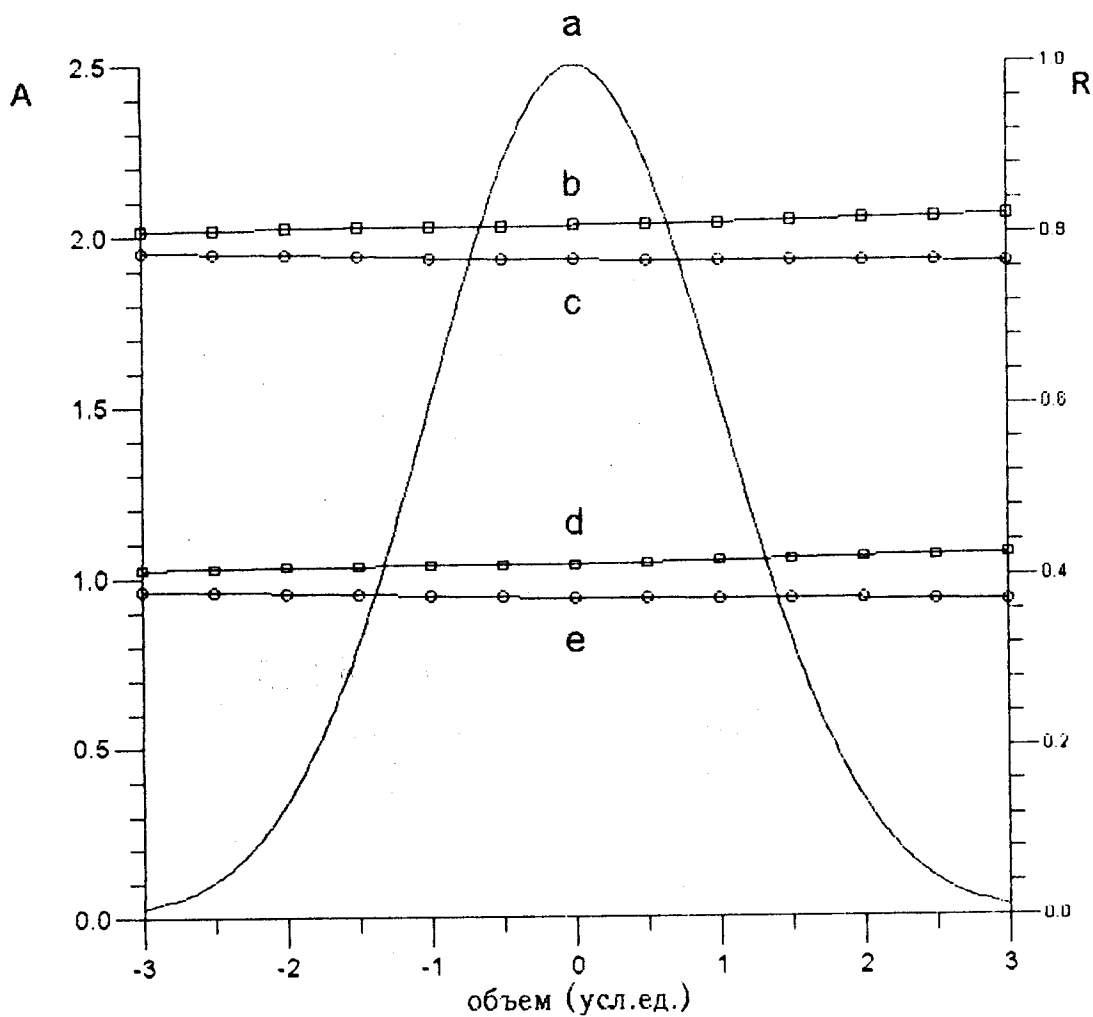


Рис. 3.6. Модельные абсорбционные отношения.
а - модельный хроматографический пик на длине волны 260 нм,
б - $A(270\text{нм})/A(260\text{нм})$, в - $A(250\text{нм})/A(260\text{нм})$,
д - $A(280\text{нм})/A(260\text{нм})$, е - $A(240\text{нм})/A(260\text{нм})$.

уменьшаются по мере прохождения пика, а для длин волн справа от него (270нм, 280нм) увеличиваются. Расчеты показывают, что при изменении направления движения пробы по отношению к развертке по длинам волн (что моделируется изменением знака в квадратных скобках для функции $S(\lambda-\lambda_0, V)$ в формуле (3.1), картина меняется на обратную.

Таким образом, противоположные наклоны абсорбционных отношений для разных склонов спектра хроматографического пика чистого вещества и инверсия этих наклонов при изменении направления потока пробы должны указывать на наличие совместного влияния спектральной ширины щели и градиента концентрации в кювете на измеряемую оптическую плотность.

Для экспериментальной проверки этого утверждения с помощью визуальной оценки под микроскопом зон преимущественной локализации окраски при прохождении пробы окрашенного раствора, транспортируемой шприцевым насосом с различной скоростью (30-200 мкл/мин) через кювету, была подобрана одна кювета, по качественной оценке отвечающая требованиям, предъявляемым моделью. Фотография поперечного сечения такой кюветы с проходящей зоной пробы приведена на рис.3.7. Затем через эту кювету в режиме псевдохроматографии прокачивалась зона уридина и регистрировались абсорбционные отношения по пику детектором "Милихрома-4" при прямом и обратном вводе пробы. Данные собирались на ЭВМ и затем обрабатывались с помощью специальной программы сбора и обработки данных "Chrom" (автор А.П.Зенков). Использовали раствор уридина в воде 0,5 мг/мл, объем пробы 5 мкл. Для формирования псевдохроматографической зоны перед вводом в кювету проба прокачивалась через вязанный специальным способом [46] фторопластовый капилляр, обес-

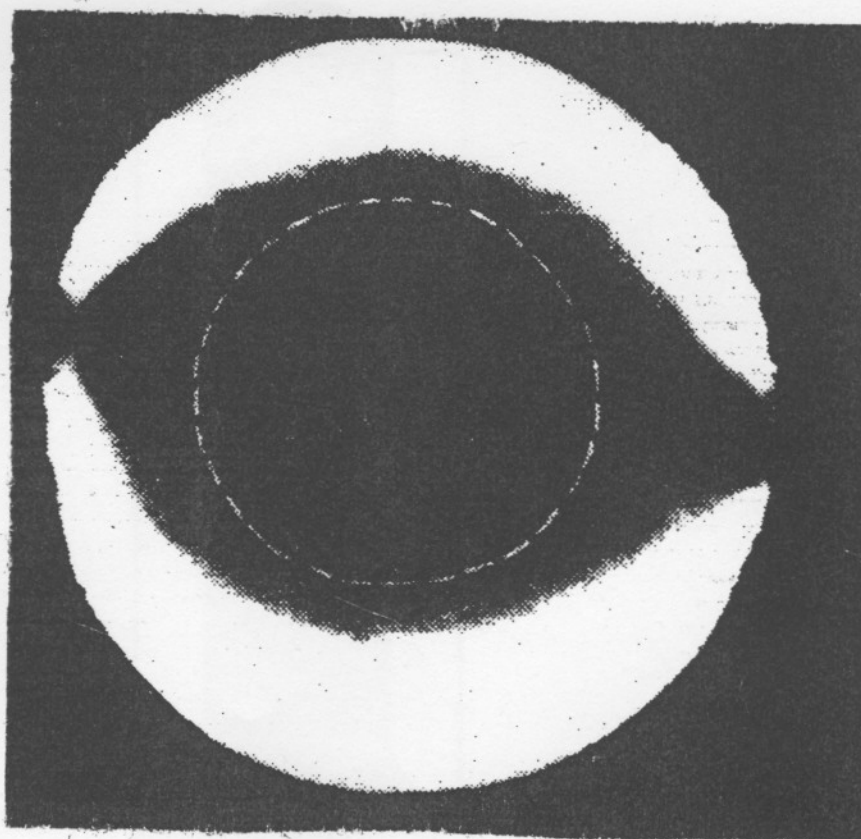


Рис.3.7. Прохождение зоны пробы через кювету с прямыми подводами.

Показано поперечное сечение кюветы (светлый круг) с проходящей через кювету зоной пробы (темное пятно грушевидной формы в центре). Белой штриховкой обозначены границы светового зонда.

печивающий хорошее перемешивание пробы с растворителем при минимальном размывании зоны. Скорость подачи пробы 100 мкл/мин.

Результаты экспериментов представлены на рис.3.8, где показан псевдохроматографический пик уридина, зарегистрированный при 260 нм, а также набор абсорбционных отношений такой же, как на рисунке 3.6, для прямого (левый рисунок) и обратного (правый рисунок) ввода пробы в кювету.

Рис.3.9 иллюстрирует воспроизводимость результатов повторных экспериментов для прямого (нижний рисунок) и обратного (верхний рисунок) ввода пробы.

Сопоставление результатов расчета и эксперимента показывает, что наблюдаемые эффекты даже значительнее предсказанных, что объясняется наличием более крутых экспериментальных градиентов концентрации в кювете, чем заложенные в модели. Небольшие отличия средних значений абсорбционных отношений объясняются систематическими сдвигами, связанными с неадекватностью модельного спектра уридина и оптического тракта, а также, возможно, небольшим сдвигом в настройке монохроматора.

Следует подчеркнуть, что используемая в этих экспериментах кювета подбиралась специально для создания заданного градиента концентрации. В штатной кювете "Милихрома-4" с "Z"-образными подводами можно подобрать условия, когда абсорбционные отношения для уридина в аналогичных экспериментах стабильны, что иллюстрирует рис.3.10 (скорость 50 мкл/мин, остальные условия те же). Однако для других веществ и других гидродинамических условий эту стабильность не всегда можно гарантировать (см., например, рис.3.1).

Проведенное исследование демонстрирует сложную взаимосвязь

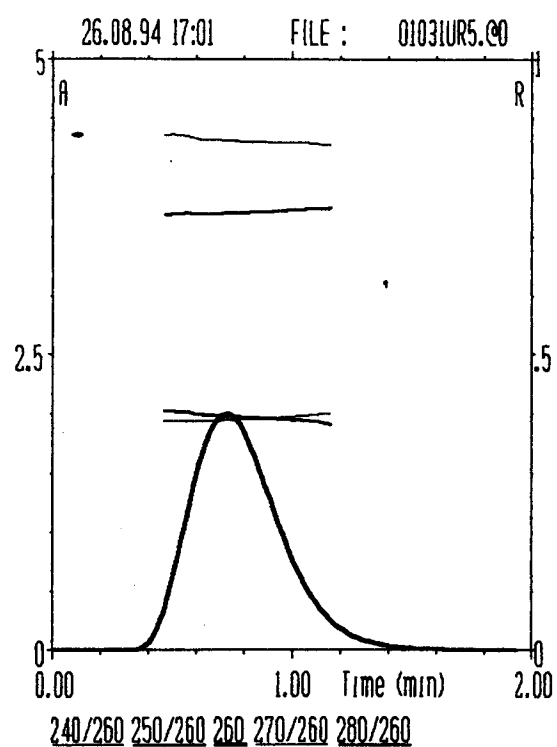
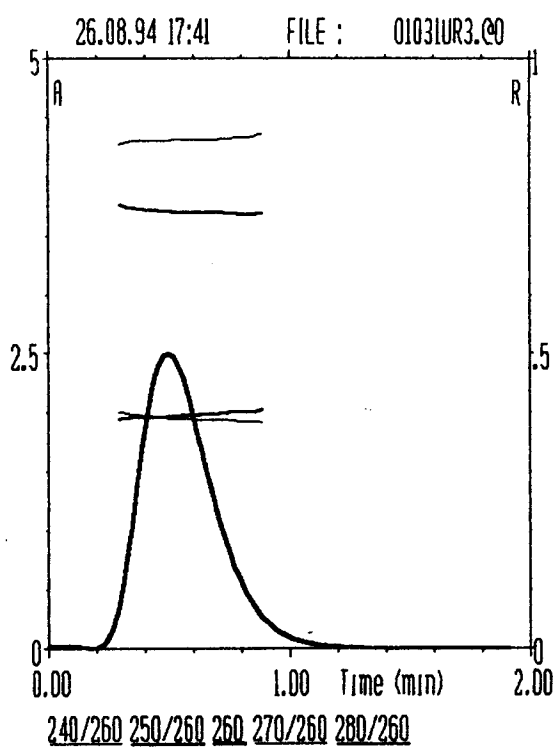


Рис.3.8. Экспериментальные абсорбционные отношения при прямом (в соответствии с модельным расчетом) и обратном вводе пробы.

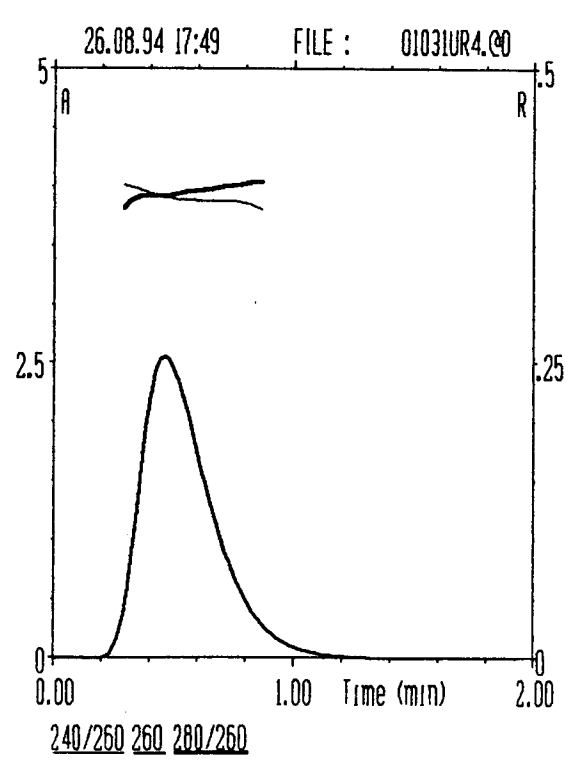
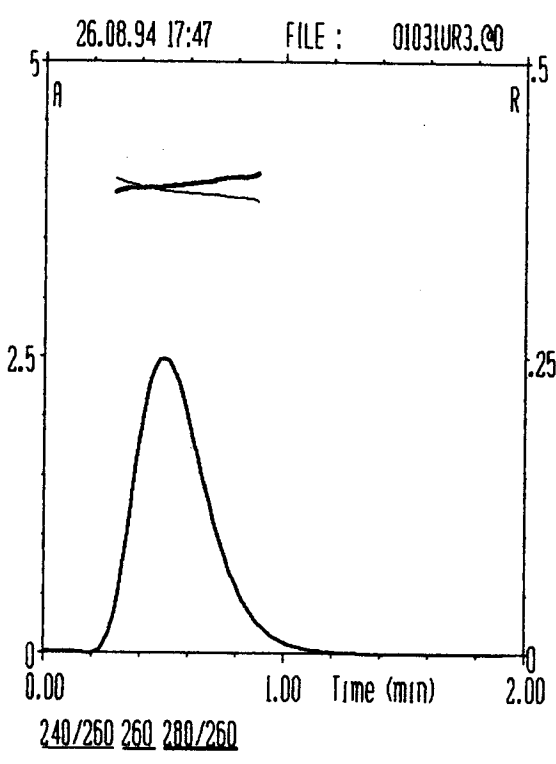
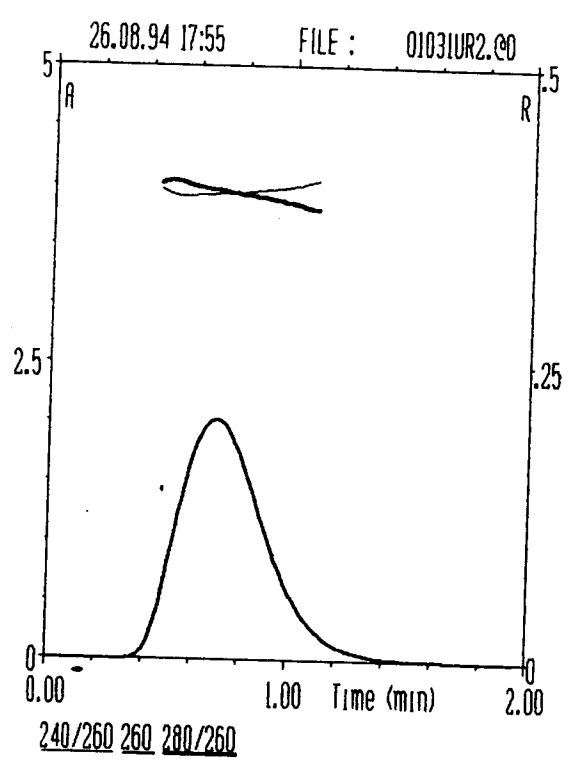
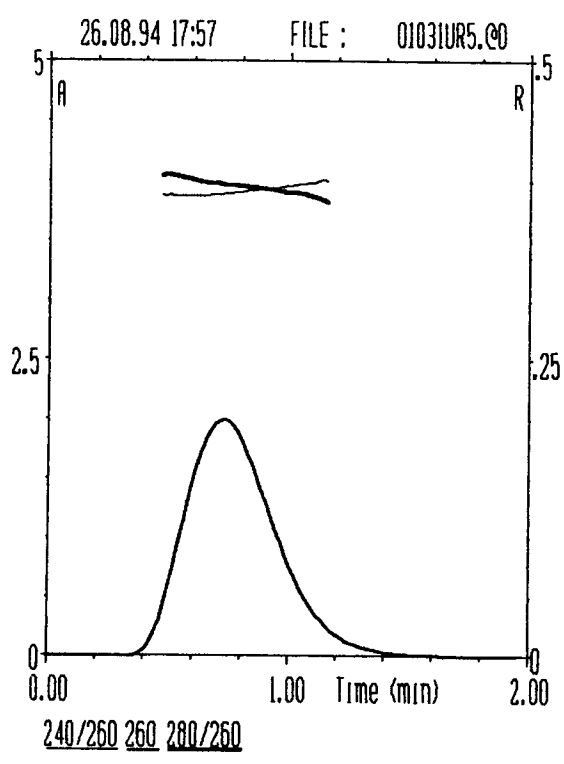


Рис.3.9. Воспроизводимость абсорбционных отношений при прямом (нижний рисунок) и обратном (верхний рисунок) вводе пробы.

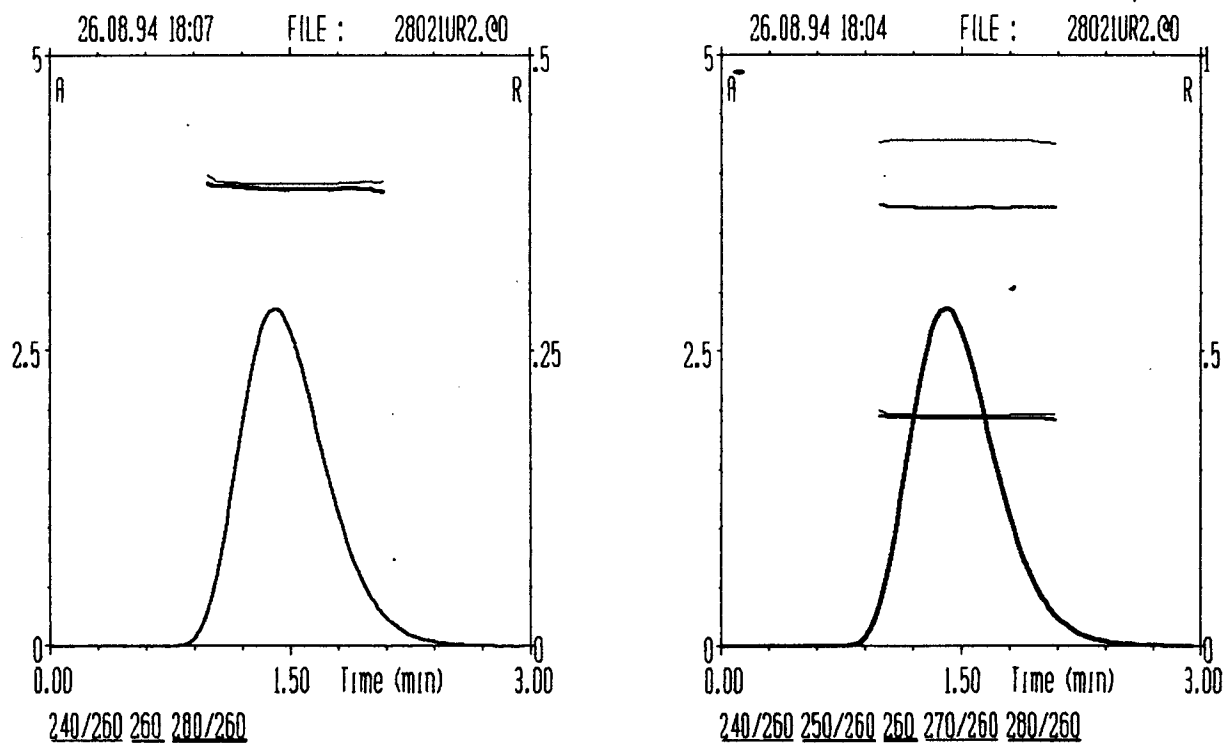


Рис.3.10. Абсорбционные отношения для уридина в штатной кювете "Милихрома-4".

факторов, приводящих к нестабильности абсорбционных отношений по пику заведомо 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 (это было показано в предыдущей главе), то наличие градиентов концентрации вдоль направления развертки по длинам волн могут приводить к несимметричным искажениям. При этом очевидно, что с изменением функции распределения концентрации 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. Для узких спектров поглощения (ширина полосы в спектре поглощения сравнима с шириной щели детектора) влияние градиентов концентрации сказывается сильнее.

Для уменьшения вклада градиента концентрации в искажение абсорбционных отношений возможно такое конструктивное решение, как изменение направления подачи пробы таким образом, чтобы направление градиента концентрации было перпендикулярно направлению развертки по длинам волн (на рис.3.2 это соответствует направлению сверху вниз, либо снизу вверх в поперечном сечении кюветы). Очевидным подходом является также улучшение условий перемешивания для создания однородного распределения пробы в кювете.

ГЛАВА 4.

ОРИГИНАЛЬНЫЙ ВОЛНОВОЙ СМЕСИТЕЛЬ ДЛЯ ГРАДИЕНТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ПОСТКОЛОНОЧНОЙ ДЕРИВАТИЗАЦИИ.

При хроматографии в микромасштабе серьезной проблемой является создание градиентного насоса с эффективным пассивным смесителем, обеспечивающим минимальное искажение формируемого градиента. Аналогичные проблемы возникают и при создании систем для постколоночной дериватизации, где необходимо обеспечить максимальное перемешивание реакционной зоны при минимальном ее размывании.

В главе 1.4 литературного обзора были показаны преимущества впечатанных и выгравированных в прозрачных твердых пластинах каналов в реакторах-смесителях. Предлагаемый нами реактор-смеситель является продолжением работ в направлении создания интегрированных микротрубопроводов, отвечающих предъявляемым требованиям (максимальное перемешивание на единицу пройденного пути при минимальном продольном размывании зоны).

4.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование.

Подача реагентов в реактор-смеситель осуществлялась системой поршневых насосов, работающих таким образом, что при введении красящего реагента (краски) суммарная скорость потока (краски и носителя) оставалась неизменной.

Детекция осуществлялась на модернизированном спектрофото-

метре типа "Милихром" в видимом диапазоне (428 нм).

Измерение давления проводилось манометром М1Д ГОСТ 2405-80.

Конструкция исследуемых реакторов и схемы проведения эксперимента описаны ниже.

Реагенты.

В качестве красящего реагента использовался 2,6-динитрофенол в 0.01 м растворе едкого кали с оптической плотностью около 6 оптических единиц. В качестве носителя и разбавителя использовался 0.01 м раствор едкого кали. Для определения эффективной гидродинамической проницаемости зависимость давления от скорости потока исследовалась на дистиллированной воде.

Конструкция реакторов-смесителей.

В работе использовались реакторы-смесители (в дальнейшем просто реакторы), условно названные волновой и прямоточный, изготовленные из стекла (с длиной пути 6.6 и 1.8 м соответственно), а также капилляр из фторопласта с гладкими стенками длиной 10 м ("идеальный" капилляр). Внутренний диаметр капиллярных каналов всех трех исследуемых реакторов (для волнового - эффективный) составлял 0.255 ± 0.003 мм.

Волновой и прямоточный реакторы представляют собой монолиты, изготовленные 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.4.1. Следует отметить, что площадь поперечного сечения такого канала не постоянна и эффективное сечение канала

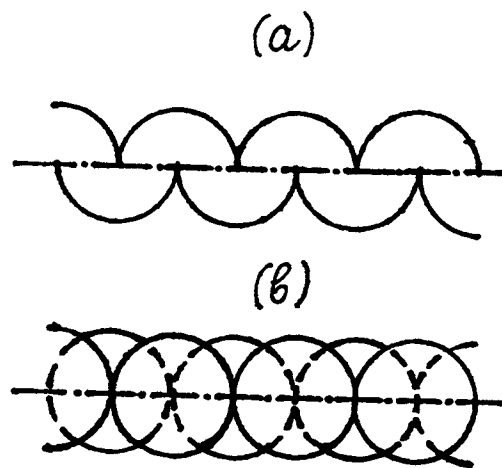


Рис. 4.1. Профиль канала волнового реактора.
а - вид сбоку, б - вид сверху.

определяется делением его объема на длину.

С целью получения компактного монолита небольших размеров каналы волнового и прямоточного реакторов расположены в пластинах змеевиком с длиной прямолинейного участка много больше, чем радиус изгиба. Кроме того, в реакторах предусмотрено необходимое количество подводящих капилляров - таким образом реакторы являются также и смесителями. Реакторы были изготовлены по нашим эскизам в Конструкторско-технологическом институте прикладной микроэлектроники (КТИПМ СО РАН).

Методика эксперимента и необходимые расчеты.

Для определения эффективной гидродинамической проницаемости ($K_{эф}$) использовалась экспериментально найденная зависимость давления от скорости потока. Расчет проводился для воды по формуле [41, 42]:

$$K_{эф} = 10^{-6} * U * \eta * L / \Delta P \quad (4.1), \quad \text{где}$$

U - скорость потока, см/сек; (равна Q/S , где Q -объемная скорость, S -площадь поперечного сечения);

η - динамическая вязкость воды, сантипуазы (1 сантипуаз = $0.01 \text{ дин} \cdot \text{сек} / \text{см}^2$);

L - длина капилляра, м;

ΔP - перепад давления, атм ($1 \text{ атм} \approx 10^6 \text{ дин} / \text{см}^2$);

$K_{эф}$ - эффективная гидродинамическая проницаемость, см^2 .

Для оценки вклада радиального массопереноса исследовали размывание зоны краски при прохождении по реактору в зависимости от скорости потока. Количественно размывание пика, описываемого кривой Гаусса, можно охарактеризовать через значение объемной

дисперсии или через квадрат ширины пика на полувысоте (в объемных единицах):

$$(\delta v)^2 = W^2/5.54 \quad (4.2),$$

где: $(\delta v)^2$ - объемная дисперсия;
 W - ширина пика на полувысоте.

Так как в дисперсию пика входят составляющие от размывания зоны краски в кювете, подводящих капиллярах и реакторе, то для выделения вклада реактора использовались следующие приемы:

- разбавление выходящего из реактора потока краски (подача разбавляющего потока при постоянном соотношении скоростей носителя и разбавителя 1:3), при этом дисперсия пика в основном будет определяться вкладом реактора;

- исключение кюветно-капиллярного вклада в размывание зоны краски путем его вычитания при прохождении краски через элементы реактора с различной длиной пути.

Как было отмечено в главе 1.4 литературного обзора, наилучшей оценкой способности реактора - смесителя к размыванию является длина смешивания, которую можно описать в терминах высоты, эквивалентной теоретической тарелке, ВЭТТ (Н). Размывание зоны краски при прохождении ее по реактору (участку реактора) оценивалось в терминах ВЭТТ в сантиметрах и определялось по формуле 4.3:

$$H = W^2/(5.54 \times S \times V \times 10) \quad (4.3),$$

где: W - ширина пика на полувысоте, мкл;

S - площадь эффективного поперечного сечения, мм^2 ;

V - объем реактора (участка реактора), мкл;

4.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Первоначальная характеристика типа потока исследуемых реакторов в терминах гидродинамической проницаемости позволяет оценить вклад "турбулентности", вызванной вторичными потоками. На рис. 4.2 приведены результаты расчета $K_{\text{эф}}$ по формуле 4.1, полученные при исследовании экспериментальной зависимости перепада давления от скорости потока.

Экспериментально найденное значение $K_{\text{эф}}$ для "идеального" капилляра совпадает с теоретическим значением гидродинамической проницаемости, $2.08 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2$, (равным $1/8$ квадрата радиуса [41, 42]) в области ламинарных по скоростям потоков.

Для проточного реактора значения $K_{\text{эф}}$ находятся ниже теоретического и практически не изменяются от скорости потока, т.е. в исследуемом диапазоне скоростей нет перехода к турбулентному потоку ($Re = 6 - 30$), но есть некоторый вклад "турбулентности", связанный с нарушением прямолинейности потока в связи с укладкой канала змеевиком.

В волновом реакторе из-за значительного вклада вторичных потоков, связанного с особенностями геометрии канала, значение $K_{\text{эф}}$ находится значительно ниже теоретической величины, $2.05 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2$, и слабо снижается с увеличением скорости потока.

Увеличение степени радиального массопереноса более подробно исследовано через зависимость N от скорости.

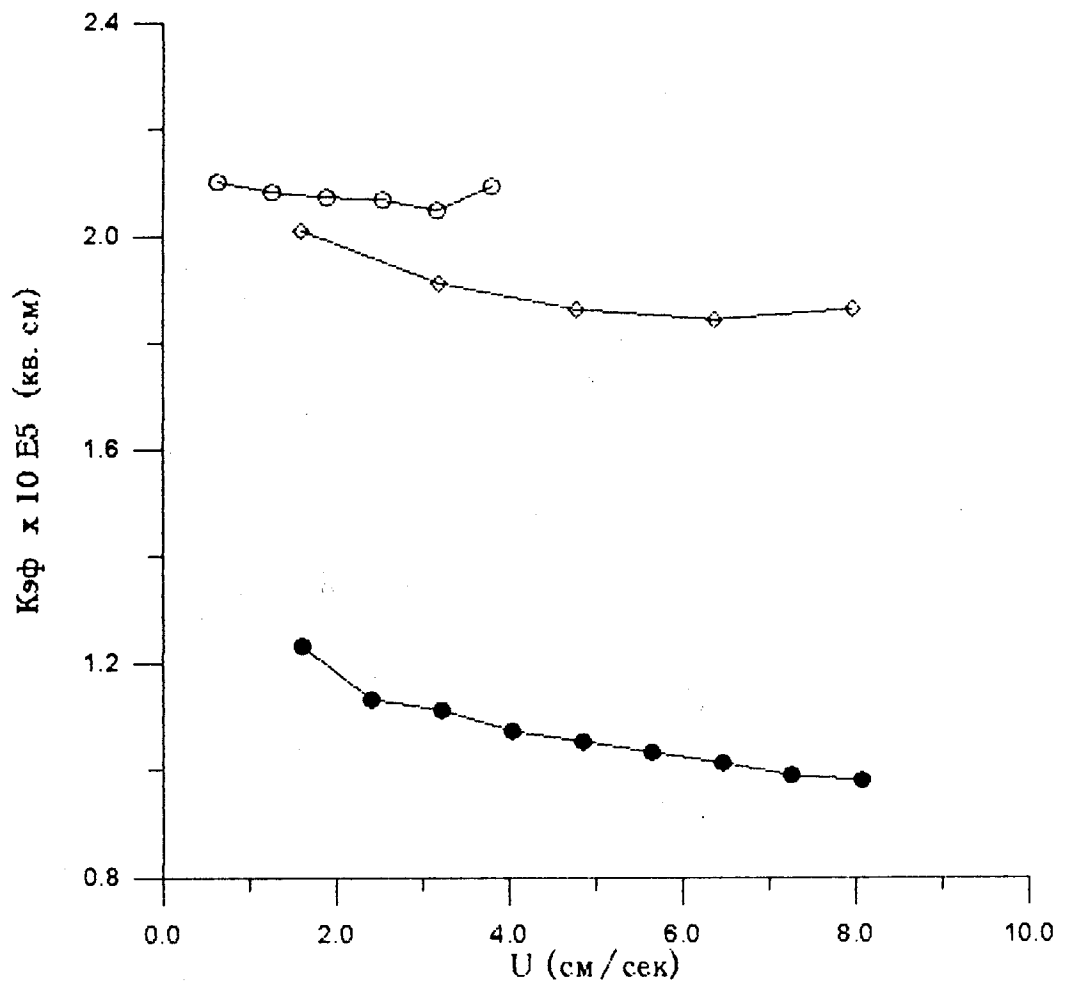


Рис. 4.2. Эффективная гидродинамическая проницаемость для волнового и прямоточного каналов и "идеального" капилляра. Незакрашенные кружки - "идеальный" капилляр, закрашенные кружки - волновой канал, ромбы - прямоточный капилляр.

Если вклад вторичных потоков существенен, то величина размывания зоны краски, выраженная в терминах ВЭТТ (H), растет с увеличением скорости значительно в меньшей степени, чем предсказано теорией идеальных капилляров для области ламинарных потоков, либо остается на одном (достаточно низком) уровне независимо от скорости. На рис. 4.3 и 4.4 показаны зависимости H от скорости потока для волнового и прамоточного реакторов, а также для "идеального" капилляра с близкими значениями внутреннего диаметра каналов, определенные двумя способами: с уменьшением кюветно-капиллярного вклада разбавлением потока и с вычитанием кюветно-капиллярного вклада. Как для "идеального" капилляра, так и для прамоточного реактора с увеличением скорости потока наблюдается существенный рост размывания зоны краски, согласующийся с теоретическими предпосылками, тогда, как величина размывания в волновом реакторе не является монотонно возрастающей: H имеет незначительный максимум в диапазоне очень низких линейных скоростей (около 5 см/сек.), и далее достигает значения 0,5 см при $U=27$ см/сек.

В таблице 4.1 приведено сравнение литературных данных по ВЭТТ для трубок различной геометрии, полученных в сопоставимых экспериментальных условиях (водные растворы, $U=27$ см/сек., близкие радиусы), с результатами для нашего волнового реактора. Таким образом, H , характерная для турбулентной области, получена для стеклянного волнового реактора при более низких линейных скоростях, чем в других случаях.

Необходимо отметить, что в экспериментах с органическими растворителями некоторым авторам удалось получить еще более низкую степень размывания зоны (H до 0,2-0,3 см), в частности для

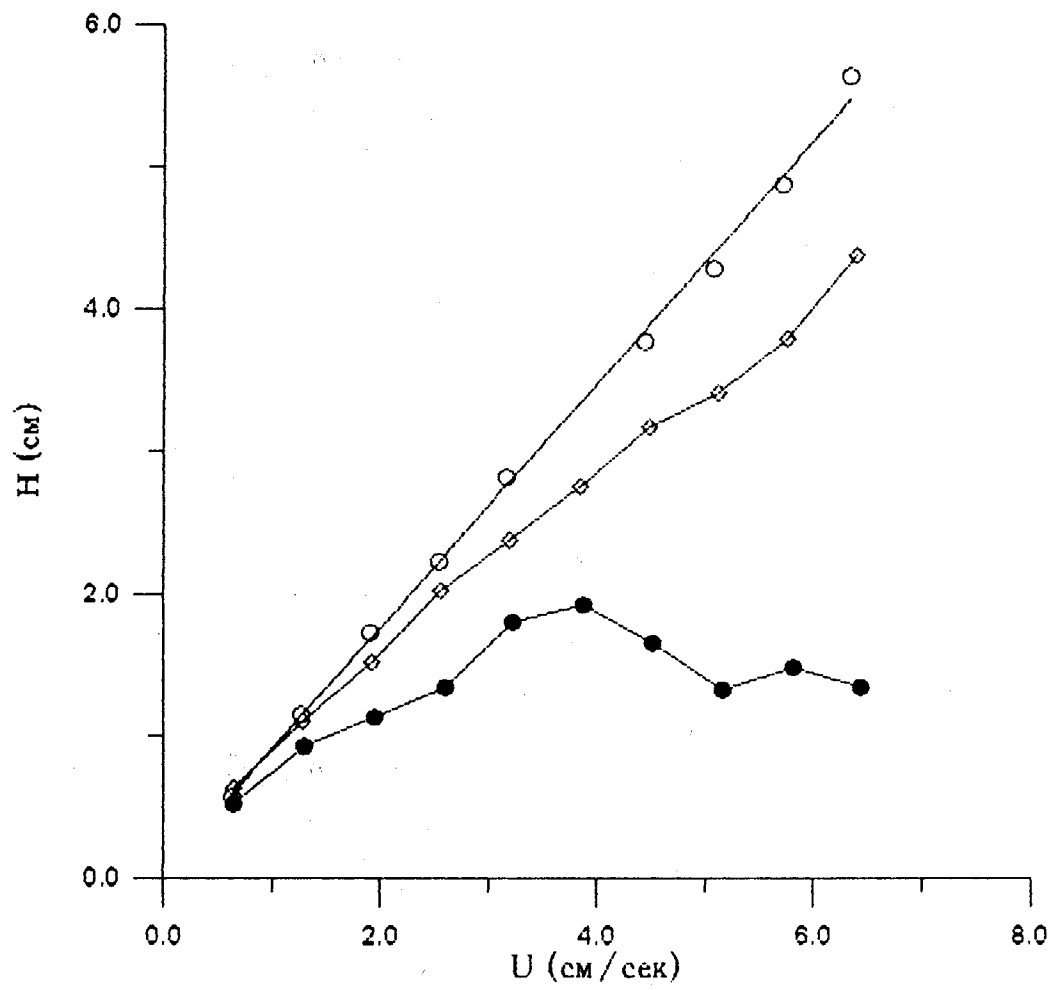


Рис. 4.3. Сравнение размывания волнового и прямого канала и "идеального" капилляра с разбавлением потока. Незакрашенные кружки - "идеальный капилляр", закрасненные кружки - волновой канал, ромбы - прямооточный капилляр.

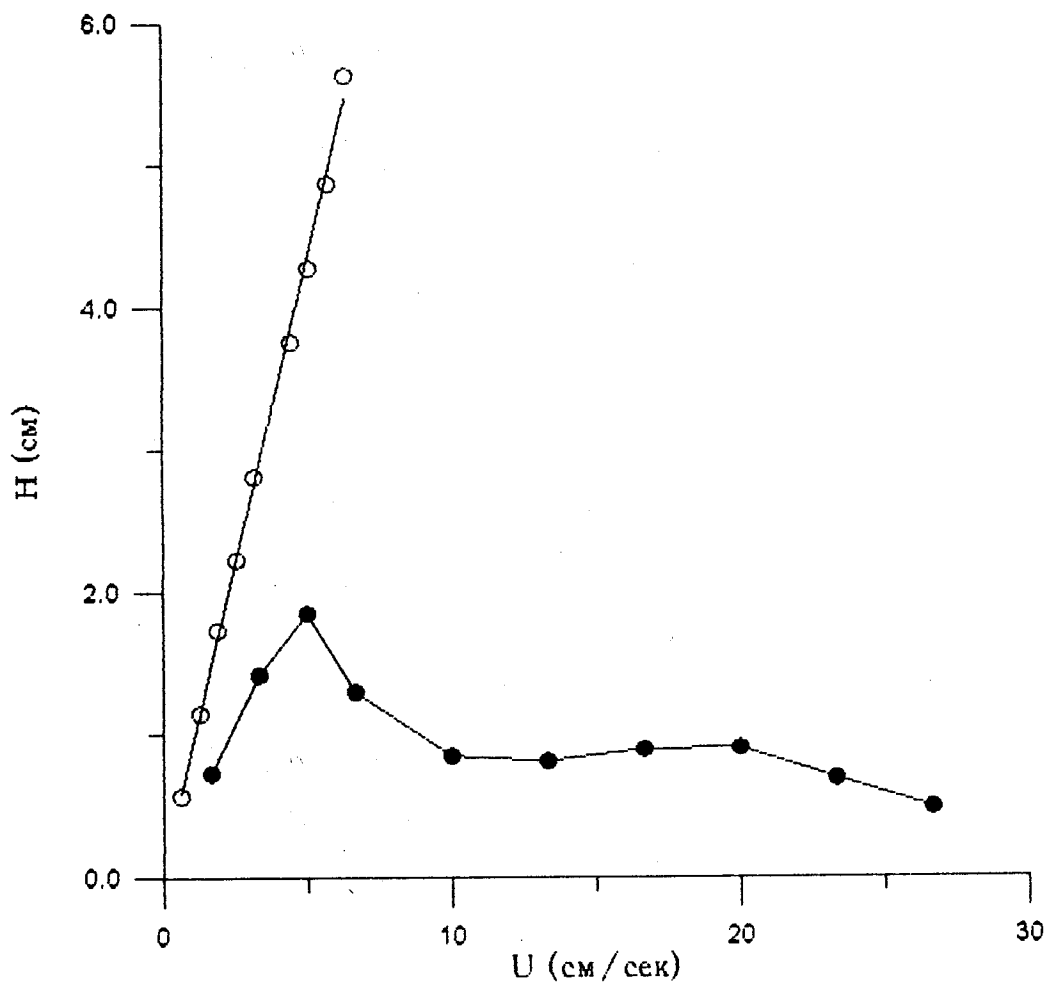


Рис. 4.4. Сравнение размывания волнового канала и "идеального" капилляра при вычитании кюветно-капиллярного вклада. Незакрашенные кружки - "идеальный" капилляр, закрашенные кружки - волновой канал.

Таблица 4.1. Сравнение литературных данных по ВЭТТ для деформированных трубок различной геометрии с экспериментальными результатами для стеклянного волнового реактора для $U=27$ см/сек.

Геометрия канала	R, мм	H, см	ссылка
Идеальный прямой капилляр	0.125	15.6	[42]
Медная прямая трубка с шероховатыми стенками	0.125	16.9	[41]
Медная трубка, свитая в спираль	0.125	6.0	[41]
Фторопластовый волнообразный капилляр	0.125	3.3	[42]
То же	0.375	3.8	[42]
Стальной капилляр с овальным сечением, закрученный винтом и свитый в спираль	0.5	2.1	[43]
Трехмерный вязаный капилляр	0.375	0.8	[46]
Исследуемый волновой стеклянный реактор	0.126	0.5	

вязанных капилляров [46] и серпентиновых трубок [43], однако, прямое сопоставление этих данных невозможно из-за различных условий эксперимента и способов представления результатов.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют сделать еще один шаг на пути построения интегрированных систем, обеспечивающих минимальную степень размывания зоны.

4.3. ГРАДИЕНТНЫЙ НАСОС ДЛЯ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

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.

При работе на серийно выпускаемых отечественных хроматографах "Милихром 1", "Милихром 2" и "Милихром 4" градиентный режим элюции осуществляется с помощью преформированного градиента - последовательного набора в шприцевой насос определенных объемов растворов различного состава при суммарном объеме градиента 2,5 мл. За счет диффузионных и конвекционных процессов ступенчатый профиль сглаживается, что позволяет добиваться удовлетворительной воспроизводимости времен удерживания [58].

При практическом использовании такого способа возникают затруднения, связанные с необходимостью точного приготовления нескольких (до десяти) растворов и с изменением состава раство-

ров элюентов в автоматизированных хроматографах за счет испарения. Кроме того, ограниченный объем стандартного шприцевого насоса не позволяет полностью реализовать эффективность хроматографических колонок длиной 80 - 120 мм, которые иногда приходится использовать при анализе сложных смесей. Для преодоления указанных затруднений разработан и изготовлен совместно с КТИПМ СО РАН, в качестве автономного устройства, градиентный насос для микроколоночной жидкостной хроматографии.

Прибор состоит из микропроцессорного электронного блока управления (контроллера), двух шприцевых насосов, поворотного крана-гидрораспределителя и планшетного пассивного цельностеклянного смесителя с волновым каналом. Гидравлическая схема градиентного насоса представлена на рисунке 4.5. В приборе используются стандартные шприцевые насосы хроматографа "Милихром" и модифицированный инжекционный кран И-025 (АО "ДИА-М", г.Москва) для перезаполнения насосов.

Микропроцессорный блок управления, имеющий на лицевой панели клавиатуру и жидкокристаллический индикатор, обеспечивает программирование и запоминание до 10-ти градиентных профилей, каждый из которых моделируется кусочно-линейной функцией с количеством линейных участков до 9-ти. При программировании каждого участка вводятся: содержание второго компонента в элюенте ($\%B$) в начале и на конце участка, объем участка, суммарная объемная скорость подачи элюента. Алгоритм управления работой насосов при отработке градиента основан на вычислении среднего значения $\%B$ на каждом текущем микроучастке объемом 5 мкл (100 шагов шагового двигателя насоса) и расчете оптимальной последовательности (наиболее равномерного чередования) шагов двигателей обоих насосов в

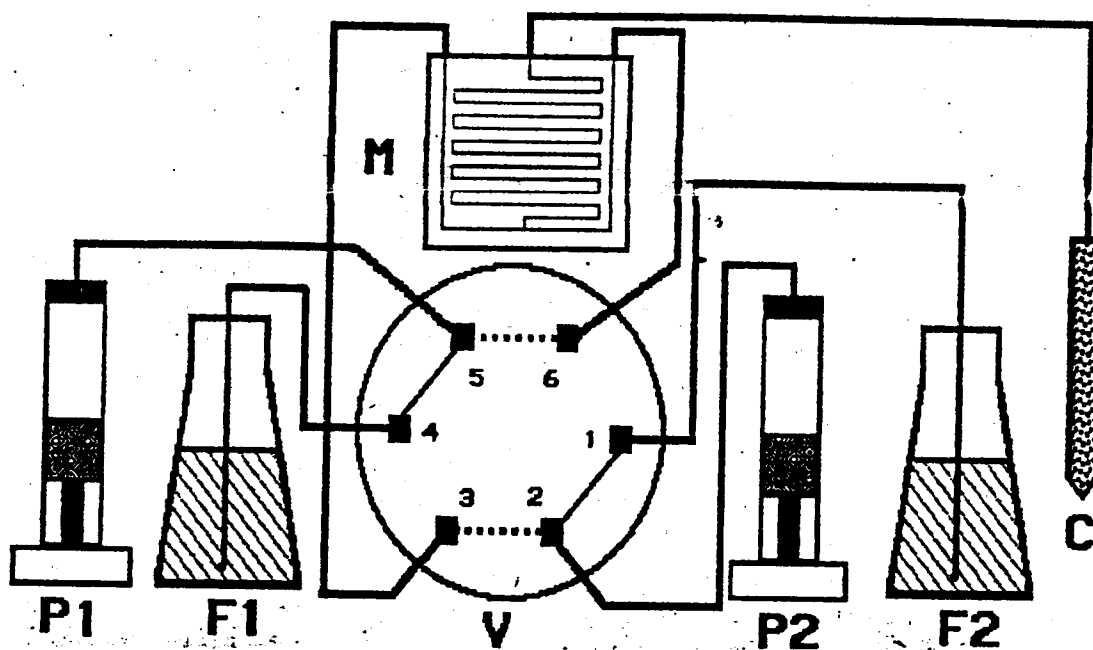


Рис. 4.5. Схема градиентного насоса.
P1, P2 - насосы, F1, F2 - сосуды с элюентами,
V - клапан, M - смеситель, C - колонка,
————— - набор, - подача.

пределах этих 100 шагов. При отработке градиента текущее значение $\%B$ выводится на индикатор и в виде аналогового сигнала выдается на самописец; последнее удобно при использовании двухканального самописца для одновременной регистрации хроматографического и градиентного профилей. Отдельной программой в контроллере задаются объем и скорость набора пробы для работы в стандартном для "Милихромов" режиме (набор пробы через иглу).

Оригинальным элементом конструкции градиентного насоса является статический смеситель, выполненный в виде цельностеклянной пластины размером $30 \times 30 \times 4$ мм с вытравленными внутри каналами круглого сечения до точки смешивания и волновым каналом, профиль которого приведен на рис.4.1, от точки смешивания до выхода. Общая длина волнового канала - 40 см. Волновой канал обеспечивает высокоэффективное перемешивание жидкостей с различными физическими свойствами (за счет создаваемого вторичными потоками радиального массопереноса) при минимальном искажении формируемого градиента. Каналы выведены на полированную торцевую поверхность пластины и соединяются с остальными элементами гидравлической системы посредством прижима развальцованного толстостенного фторопластового капилляра с внутренним диаметром 0,3 мм. Вся система выдерживает давление не менее 60 атм. Гидродинамическое сопротивление смесителя не превышает 2-3 атм при расходах элюента (вода, метанол) до 200 мкл/мин.

Известно [52], что все градиентные насосы со смесителем в линии высокого давления в той или иной степени искажают задаваемый контроллером градиент. Главный источник этих искажений - конечный объем смесителя и коммуникаций его с колонкой. Для количественной оценки величины этого эффекта в качестве компонента B

использовали раствор уридина в воде, выходной капилляр смесителя соединяли непосредственно с кюветой детектора "Милихром 4" и сопоставляли обрабатываемый градиент с задаваемым регистрацией оптической плотности при 260 нм. Представленный на рис.4.6 измеренный градиент (задано: 0 - 100 мкл - 2%B, 700 мкл - 75%B, 1300 мкл - 0%B) имеет близкую к заданной форму с максимумом 73,5%; с учетом большой крутизны градиента это свидетельствует о незначительном искажении заданного профиля. Аналогичный вывод следует и из данных рис.4.7, на котором приведены зарегистрированные на двухканальном самописце заданный и измеренный градиентные профили. Максимальное значение измеренного профиля составляет 73,0% вместо 75%; увеличение расхождения обусловлено большей крутизной ниспадающего участка.

Как видно из рис. 4.6 и 4.7, обрабатываемые градиентным насосом линейные участки имеют соответствующие заданным наклоны, но на них просматриваются заметные волнообразные отклонения от линейности. Это обусловлено тем, что серийно выпускаемые насосы к хроматографу "Милихром" обнаруживают значительные пульсации; пиковая амплитуда этих пульсаций, оцененная по специально разработанной нами методике, может достигать у отдельных насосов 15 - 20%. Используемые нами насосы характеризовались амплитудой пульсаций около 6%. Эти оценки, как и приведенные на рис.4.6 и 4.7 данные, получены при работе насосов без заметного гидродинамического сопротивления. В реальных условиях гидродинамическое сопротивление хроматографических колонок составляет 30 - 40 атм., вследствие чего результирующая амплитуда пульсаций уменьшается в 5 - 7 раз (за счет демпфирующего влияния сжимаемости жидкостей и эластичности фторопластового капилляра).

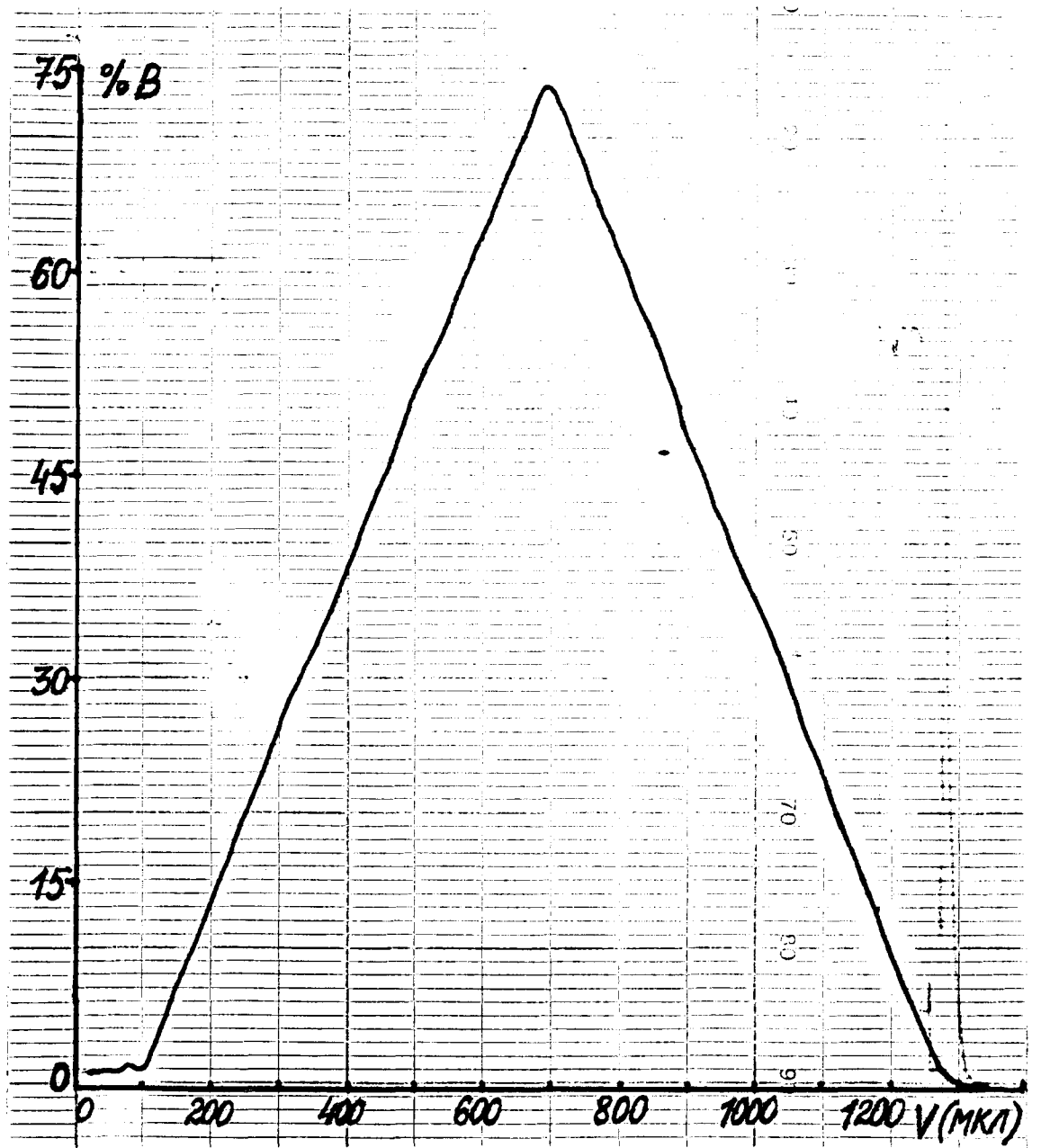


Рис. 4.6. Пример отработки градиента треугольной формы.

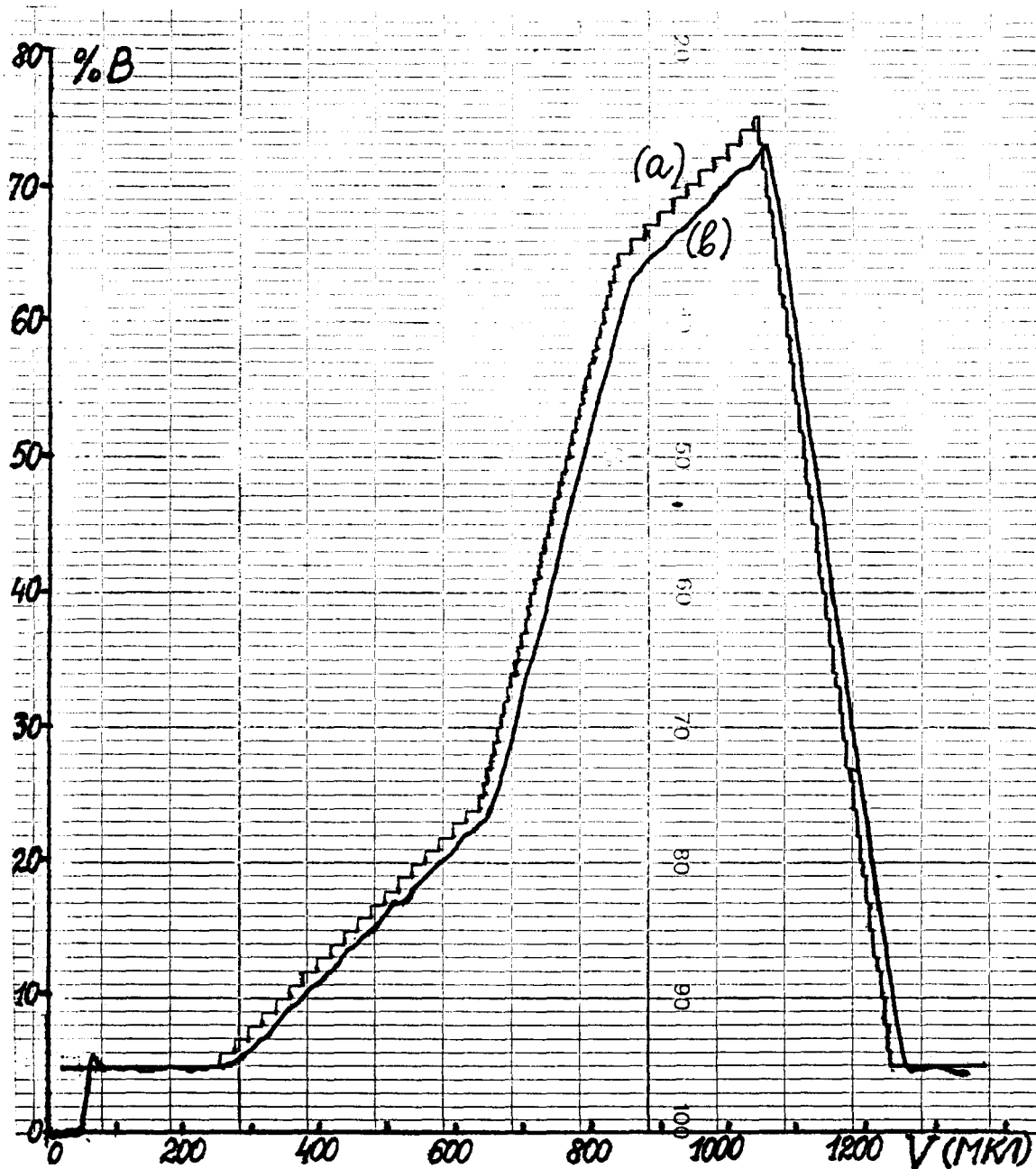


Рис. 4.7. Сопоставление задаваемого (а) и обрабатываемого (б) градиента.

Разработанный градиентный насос позволяет проводить как градиентную, так и изократическую хроматографию с суммарным объемом элюента до 5 мл. Кроме описанного и охарактеризованного выше смесителя был изготовлен и предварительно опробован реактор - смеситель с длиной канала от точки смешивания до выхода - 8 м, объемом 600 мкл. Предварительные оценки показали, что при соотношении скоростей потоков элюент - реагент 1 : 5 кажущаяся эффективность хроматографической колонки уменьшается незначительно. После изготовления реактора-смесителя с волновым каналом оптимальной топологии появится реальная возможность реализации постколоночной дериватизации в микромасштабе; при этом насос будет использоваться для подачи реагента.

ГЛАВА 5.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ НОВОГО ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ДЕТЕКТОРА ХРОМАТОГРАФА "МИЛИХРОМ-4".

Одно из направлений расширения аналитических возможностей хроматографа "Милихром-4" - использование более чувствительной и селективной флуориметрической детекции.

Разработанный совместно с Конструкторско-технологическим институтом прикладной микроэлектроники СО РАН флуориметрический детектор предназначен для работы в составе микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром-4" (макетный образец получил название "Милихром-4М-F") и значительно расширяет области применения прибора. Флуориметрический детектор позволяет регистрировать интегральную интенсивность флуоресценции на любой фиксированной длине волны возбуждения в диапазоне 190-360 нм, модернизированный блок питания детектора обеспечивает возможность использования в качестве источника света как дейтериевой лампы ДДС-30 (штатный источник света хроматографа "Милихром"), так и ртутной лампы ДРГС-12, что позволяет увеличить чувствительность детекции при длине волны возбуждения 254 нм в 5-7 раз, т.к. на линию 253,7 нм в спектре ртутной лампы приходится около 95% энергии излучаемого света. Кроме того, флуориметрический детектор позволяет снимать УФ спектры возбуждения веществ (только с ДДС-30) в диапазоне 190-360 нм, а также использовать многоволновой режим регистрации при хроматографии аналогично многоволновой фотометрии.

Основным элементом конструкции флуориметрического детектора

является флуориметрическая кювета. Вогнутое зеркало с отверстием для возбуждающего света, расположенное сзади ячейки для анализируемых веществ, обеспечивает высокую эффективность сбора излучаемого света, который направляется на фотоприемник. (Аналогичная конструкция флуориметрической кюветы детектора Kratos FS-970 приведена в [51, 52, 53]). Конструктивно флуориметрическая кювета полностью совместима с оптико-механическим блоком УФ детектора хроматографа "Милихром" и взаимозаменяема с фотометрической кюветой без дополнительной юстировки. Геометрические размеры кюветы: длина-1.8 мм, диаметр-1.2 мм, объем-3 мкл. Разработал кювету Сергей Владимирович Кузьмин - автор и конструктор всех оптических узлов всех "Милихромов" и предыдущих макетов, скоропостижно скончавшийся в 1986 г.

Модернизированная программа хроматографа, автором которой является Ю.А.Болванов, обеспечивает как алгоритм измерения оптической плотности УФ-детектора с логарифмическим законом преобразования, так и измерение флуоресценции с линейным законом преобразования. Результаты измерений отображаются на мониторе хроматографа и выводятся на самописец на любом из поддиапазонов от 0.05 до 10 относительных единиц. Возможна также и первичная математическая обработка хроматографических данных как при регистрации оптической плотности, так и при измерении флуоресценции. Обеспечена и связь с ЭВМ по программе "Chrom" (автор А.П.Зенков).

Для исследования возможностей нового флуориметрического детектора и сравнения его с фотометрическим детектором нами были выбраны два вещества из класса полициклических ароматических углеводородов (антрацен и бенз(а)пирен), которые часто привлекают

внимание исследователей при анализе объектов окружающей среды флуориметрическим методом.

Использовали растворы бенз(а)пирена фирмы "Fluka AG, Buchs SG" и антрацена квалификации "ч" в очищенном ацетонитриле. Хроматографию проводили смесью ацетонитрил-вода (85:15) в качестве элюента на стандартных колонках "Милихром-4" (62*2 мм, наполненных Lichrosorb RP-18, 5 мкм, "Merck", ФРГ) со скоростью 100 мкл/мин. Объем пробы 10 мкл. При фотометрическом определении в ультрафиолетовой области спектра (УФ) регистрация велась при 250 нм для антрацена и 296 нм для бензпирена; флуориметрическая регистрация (ФЛМ) проводилась с использованием ртутной лампы на длине волны возбуждения 254 нм. Пределы обнаружения, определенные как концентрация вещества в пробе, при которой амплитуда сигнала втрое превышает уровень шума, составили:

для антрацена с УФ-детекцией	-25 нг/мл,
для бенз(а)пирена с УФ-детекцией	-100 нг/мл,
для антрацена с ФЛМ-детекцией	-0.5 нг/мл,
для бенз(а)пирена с ФЛМ-детекцией	-2 нг/мл.

Пределы обнаружения, достигнутые при флуориметрической детекции, примерно в 50 раз ниже, чем при фотометрической детекции и сравнимы с аналогичными, описанными в работе [54] для флуориметрического детектора с двойным монохроматором и ртутно-ксеноновой лампой мощностью 200 Вт в качестве источника излучения. Пример хроматографического разделения стандартных растворов антрацена и бензпирена на уровне предела обнаружения показан на рис. 5.1.

Типичные калибровочные графики для флуориметрического определения антрацена и бензпирена приведены на рис.5.2. Разная

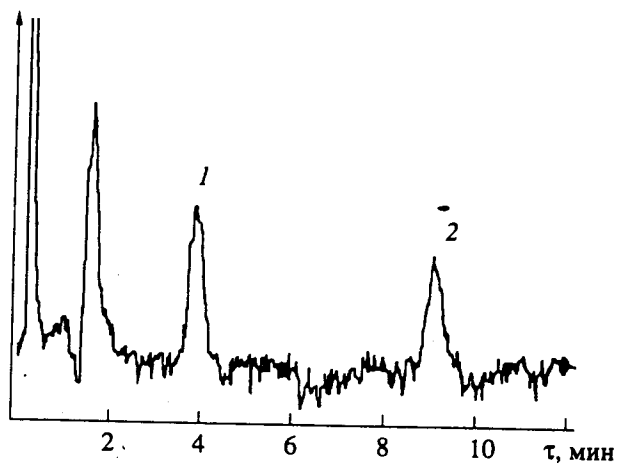


Рис. 5.1. Хроматограмма стандартных растворов антрацена (1) и бенз(а)пирена (2) на уровне пределов обнаружения. Постоянная времени 2 сек, остальные условия приведены в тексте.

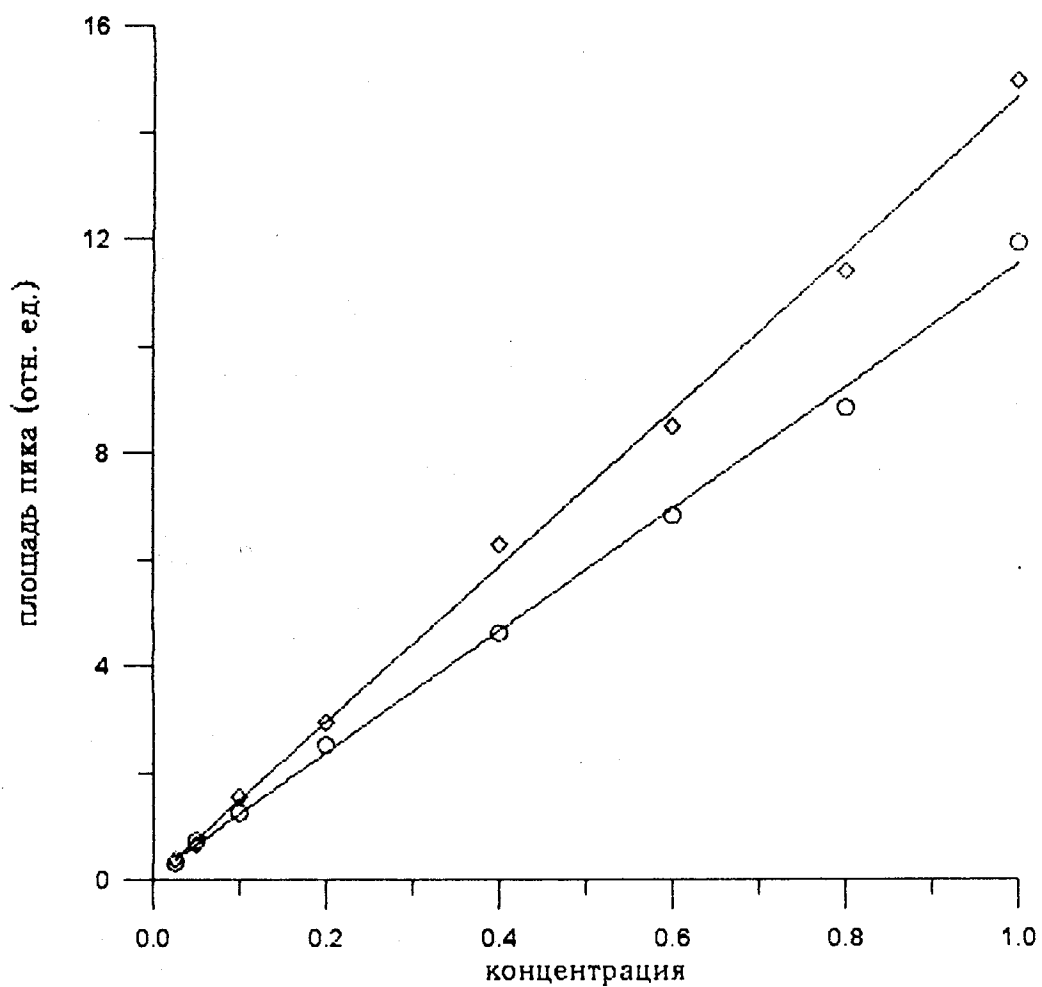


Рис.5.2. Калибровочные графики количественного хроматографического определения антрацена (кружки) и бенз(а)пирена (ромбы) с флуориметрической детекцией. Диапазоны концентраций (0 - 1.0) от 0 до 20 нг/мл для антрацена и от 0 до 100 нг/мл для бенз(а)пирена.

чувствительность по веществам объясняется значительным различием коэффициентов экстинкции. Относительное стандартное отклонение для середины приведенных диапазонов концентраций составляет около 0.06.

На рис. 5.3 представлены спектры возбуждения раствора бенз(а)пирена в ацетонитриле (4.5 мкг/мл), снятые на описываемом детекторе с дейтериевой лампой в качестве источника возбуждения, и на флуориметре MPF-4, "Hitachi", Япония. Из приведенных данных видно, что спектры флуоресценции, полученные с помощью нового детектора, могут быть использованы для идентификации веществ только при наличии соответствующих стандартов. Спектры качественно сходны, расхождения же объясняются следующими причинами: "Hitachi" - прибор с двумя монохроматорами, и регистрация проводилась при фиксированной длине волны эмиссии - 405 нм, в то время, как флуориметрический детектор "Милихрома" регистрирует весь излучаемый свет. Вторая причина - существенное различие спектральной ширины щели для двух приборов. Третья и главная причина - эффекты, связанные с зависимостью интенсивности возбуждающего света от длины волны.

Рассмотрим подробнее две последние причины. Исходя из предположения, что для большинства веществ спектры возбуждения флуоресценции аналогичны спектрам поглощения [50], для вычленения сглаживающего влияния спектральной щели, были измерены спектры поглощения на спектрофотометре Specord M40 с узкой щелью (0,1 нм) и на спектрофотометрическом детекторе хроматографа "Милихром-4" (ширина щели 5 нм). Спектры поглощения бенз(а)пирена для двух приборов приведены на рис. 5.4. В спектре поглощения на рис. 5.4 и в спектре возбуждения на рис. 5.3, снятых на "Милихроме", наб-

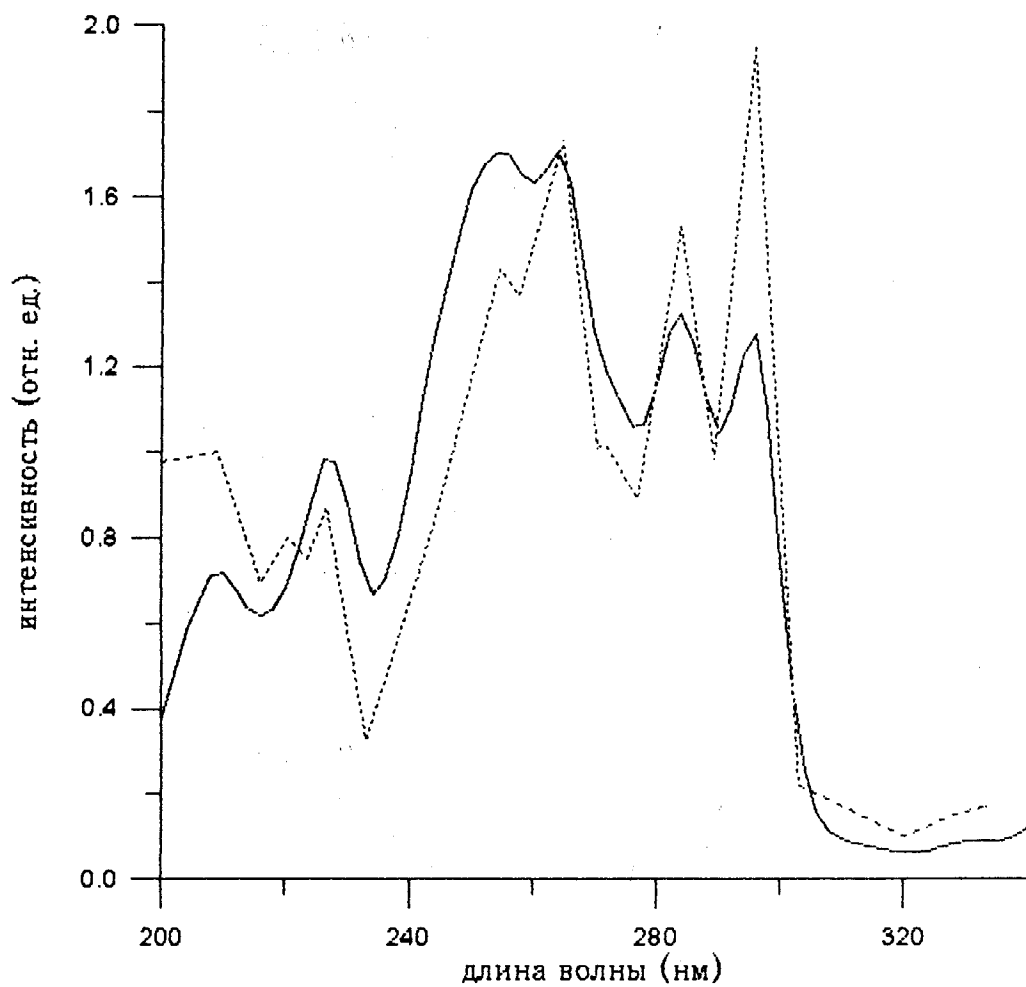


Рис. 5.3. Спектры возбуждения бенз(а) пирена, снятые на флуориметрическом детекторе хроматографа "Милихром-4М-Ф" (сплошная линия) и на флуориметре МРФ-4 "Hitachi", Япония (прерывистая линия).

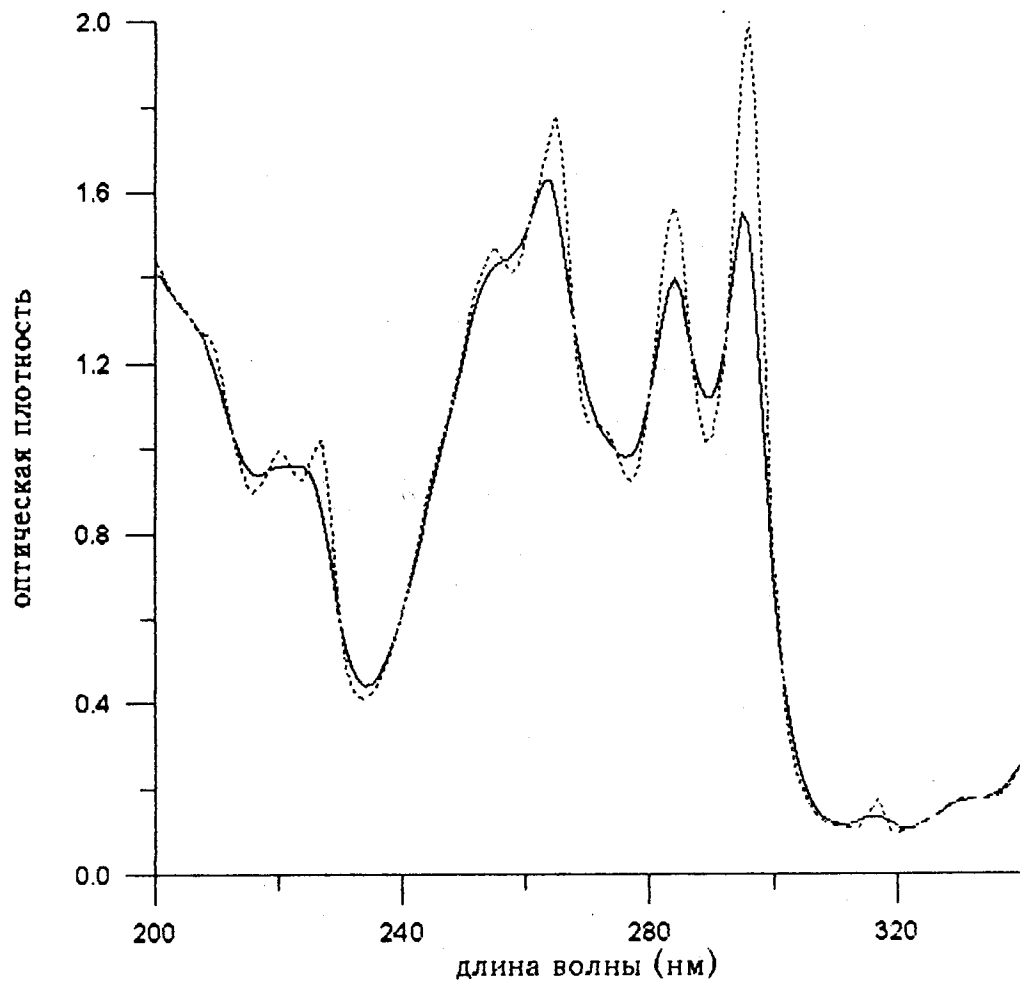


Рис. 5.4. Спектры поглощения бенз(а)пирена для двух приборов. прерывистая линия - снятый на спектрофотометре Specord M40 с узкой щелью; сплошная линия - снятый на "Милихроме-4" (ширина щели 5 нм).

людается значительное сглаживание полос. Однако, более сильные расхождения в спектрах поглощения и спектрах возбуждения флуоресценции ниже 280 нм невозможно объяснить сглаживающим влиянием широкой спектральной щели. Они обусловлены специфическими эффектами, связанными с особенностями оптического тракта конкретного "Милихрома". Оптический тракт для данного детектора показан на рис. 2.1 под номером 2. Интервал длин волн, соответствующий максимуму пропускания оптического тракта, согласуется с интервалом длин волн в спектре возбуждения на рис. 5.3, где наблюдается неожиданно высокая интенсивность флуоресценции. Поскольку измерения интенсивности флуоресценции абсолютны, а не относительны, как при фотометрии, то вариабельность оптических трактов (как, например, на рис. 2.1) может приводить к значительно большим отличиям в спектрах возбуждения флуоресценции для разных флуориметрических детекторов "Милихрома", чем для фотометрических.

Для правильного выбора направления дальнейшего совершенствования флуориметрического детектора важно определить, какой из элементов оптического тракта: источник света, зеркальные элементы монохроматора или фотоприемник (ФЭУ) - в наибольшей степени ответственны за неидентичность оптических трактов различных приборов одной серии.

Для выявления основных факторов были проведены специальные эксперименты. Регистрировали изменения оптического тракта одного и того же детектора "Милихром-4" при последовательной замене следующих элементов: 1) источника света (различные лампы ДДС-30) при неизменной системе зеркал и ФЭУ; 2) ФЭУ при неизменной лампе и зеркалах; 3) некоторых из доступных зеркал при неизменной лампе и ФЭУ. Результаты последнего эксперимента представлены на

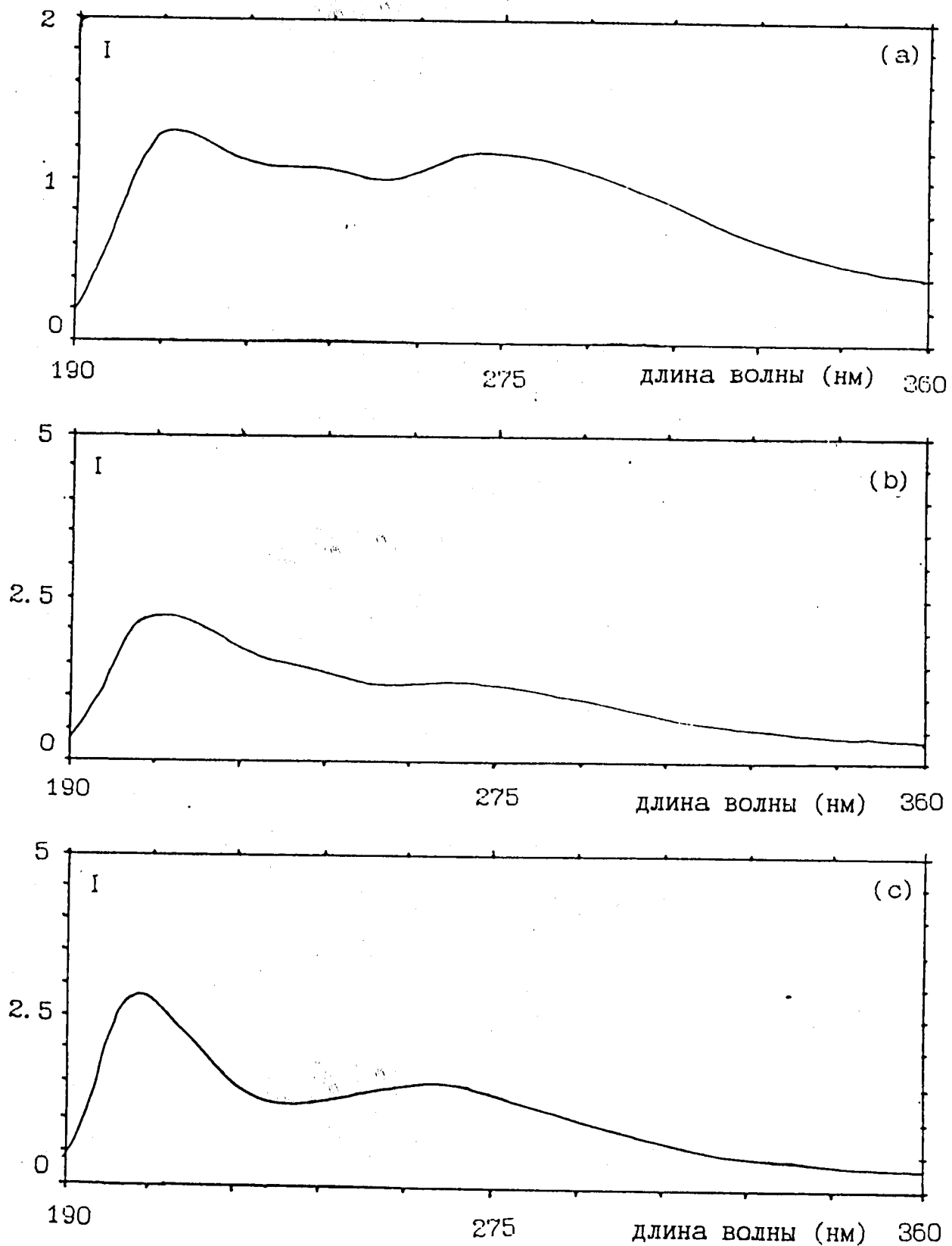


Рис. 5.5. Оптические тракты для одного детектора при последовательной замене системы зеркал. Три варианта замены.

рис. 5.5.

На основании анализа изменений в оптических трактах, регистрируемых при перечисленных заменах, сделан вывод об определяющем влиянии системы зеркал на форму оптического тракта, в то время, как характеристики лампы и ФЭУ не имеют такого большого значения. Поскольку обеспечение идентичности отражающих характеристик системы зеркал монохроматора является наиболее трудноразрешимой проблемой, дальнейшие усилия необходимо направить на компенсацию различий интенсивности возбуждающего света при разных длинах волн. Все предпосылки для такого решения проблемы неидентичности оптических трактов имеются, т.к. оптическая схема предусматривает наличие опорного канала для возбуждающего света.

Таким образом, вариант нового флуориметрического детектора с ртутной лампой в качестве источника возбуждения позволяет существенно понизить пределы обнаружения по сравнению с фотометрией, а вариант с дейтериевой лампой - реализовать режим одновременной многоволновой регистрации с использованием алгоритмов обработки результатов, описанных в главе 1.1 литературного обзора. На основании анализа ошибок при измерении флуоресценции на новом флуориметрическом детекторе намечены пути его дальнейшего совершенствования.

ВЫВОДЫ.

1. Разработан алгоритм для компьютерной программы, впервые позволяющий 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 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 задаваемого градиента и минимальное размывание преформированных зон. Показаны преимущества волнового канала по сравнению с каналами другой геометрии.

ЛІТЕРАТУРА.

1. Brown S.D., Bear R.S., Blank T.B. Chemometrics. //Anal.Chem.-1992.-V.64.-N12.-P.R42-R49.
2. Ostojic N. New approach to chromatogram interpretation by multiple detection. //Anal.Chem.-1974.-V.46.-P.1653-1659.
3. Yost R., Stoven J. and MacLean W. Positive peak identification in liquid chromatography using absorbance rationing with a variable-wavelength spectrophotometric detection. //J.Chromatogr.-1977.-V.134.-P.73-82.
4. Bylina A., Sybilska D., Grabovski Z.R. and Koszewski J. Rapid-scanning spectrophotometry as a new detection system in chromatography. //J.Chromatogr.-1973.-V.83.-P.357-362.
5. Fell A.F., Scott H.P., Gill R. and Moffat A.C. Novel techniques for peak recognition and deconvolution by computer-aided photodiode array detection in high-performance liquid chromatography. //J.Chromatogr.-1983.-V.282.-P.123-140.
6. Drouen A.C.J.H., Billiet H.A.H. and DeGalan L. Dual - wavelength absorbance ratio for solute recognition in liquid chromatography. //Anal.Chem.-1984.-V.56.-P.971-978.
7. White P.C. Use of dual-wavelength UV detection in high performance liquid chromatography for the identification of barbiturates. //J.Chromatogr.-1980.-V.200.-P.271-276.
8. White P.C. and Catterick T. Evaluation of a rotating disc multiwavelength ultraviolet high-performance liquid chromatographic detector for the identification of barbiturates and other drugs. //J.Chromatogr.-1983.-V.280.-P.376-381.
9. White P.C. and Catterick T. Avaluation of absorbance ratio-

ning for solute identification in high-performance liquid chromatography using a diode-array detector. //J.Chromatogr.-1987.-V.402.- P.135-147.

10. Sharaf H., Arroy G. and Perkins R. Estimation of errors in absorbance ratio measurements.//J.Chemometrics.1991.V.5.P.291-298.

11. Carter G.T., Schiesswohl R.E., Burke H. and Yang R. //J. Pharm. Sci.-1982.-V.71.-P.317-321.

12. Poile A.F. and Conlon R.D. Numerical spectroscopy absorbance index technique and algorithm for qualitative analysis in liquid chromatography. //J.Chromatogr.-1981.-V.204.-P.149-152.

13. Alfredson T. and Sheehan T. //Am.Lab.-1985.-V.17.-P.40-54.

14. White P.C. Comparison of absorbance ratios and peak purity parameters for discrimination of solutes using high-performance liquid chromatography with multi-wavelength detection. //Analyst.-1988.-V.113.-P.1625-1629.

15. Marr J.G.D., Seaton G.G.R., Clark B.J. and Fell A.F. Multiple absorbance ratio correlation - a new approach for assessing peak purity in liquid chromatography. //J.Chromatogr.-1990.-V.506.-P289-301.

16. Reid I.C. and Wong E.C. Data - reduction and - search system for digital absorbance spectra. //Appl.Spectrosc.-1966.-V.20.- P.320-325.

17. Frank Jr., Braat A. and Duine J.A. Assessment of protein purity by chromatography and multiwavelength detection. //Anal.Biochem.-1987.-V.162.-P.65-73.

18. Castledine J.B., Fell A.F., Modin R. and Selberg B. Assessment of chromatographic peak purity by means of multi-wavelength detection and correlation-based algorithms. //J.Chromatogr.

-1992.-V.592.-P.27-36.

19. Castledine J.B., Fell A.F. Strategies for peak-purity assessment in liquid chromatography. //J.Pharm.Biomed.Anal.-1993.-V.11.-N1.-P.1-13.

20. Stewart J.E. Spectral - bandwidth effects of variable - wavelength absorption detectors in liquid chromatography. //J.Chromatogr.-1979.-V.174.-P.283-290.

21. Carr P.W. Effect of detector nonlinearity on the height, area, width, and moments of chromatographic peaks based on a Gaussian model. //Anal.Chem. -1981. -V.52. -P.1746-1750.

22. McDowell L.M., Barber W.E., Carr P.W. Effect of detector nonlinearity on the height, area, width, and moments of peaks in liquid chromatography with absorbance detectors. //Anal.Chem. -1981.-V.53.-P.1373-1376.

23. Hogness T.R., Zscheile F.P. and Sidwell A.E. Photoelectric spectrophotometry. An apparatus for the ultra - violet and visible spectral regions: its construction, calibration, and application to chemical problems. //J.Phys.Chem.-1937.-V.41.-N3.-P.372-415.

24. Back E., Felicetta V.F. and McCarthy J.L. Absorbance corrections for finite slit width with nonuniform absorbants. //Anal.Chem.-1958.-V.30.-N11.-P.1875-1877.

25. Кузякова Т.М., Полякова И.Б., Цуканов П.Н. Влияние изменения полуширины светофильтров на линейность и чувствительность медицинских абсорбциометров. //Новости медицинской техники. Всес. Научно - исследовательский ин-т медицинского приборостроения, -вып.5. -М, 1982.-С.33-38.

26. Wenfworth W.E. Dependence of the Beer-Lambert absorption law

- on monochromatic radiation. //J.Chem.Educ. -1966. -V.43. -N5. -P.262-264.
27. Eberhardt W.H. Slit - width effects in spectrophotometry. //J.Optical Society.-1950.-V.40.-N3.-P.172-176.
28. Agtendenbos J. and Vink J. The error in absorption measurements caused by the use of non-monochromatic light - I. Parabolic functions. //Talanta.-1971.-V.18.-P.467-473.
29. Torkington P. Band shape and slit width. //Appl.Spectrosc.-1980.-V.34.-N2.-P.189-193.
30. Strong III F.C. Correlation of measurements of absorbance in the ultraviolet and visible regions at different spectral slit-width. //Anal.Chem.-1976.-V.48.-N14.-P.2155-2161.
31. Dose E.V. Guiochon G. Bias and nonlinearity of ultraviolet calibration curves measured using diode - array detectors. //Anal.Chem.-1989.-V.61.-P.2571-2579.
32. Lempicki A., Samelson H. and Brown A. Slit - width error in the measurement of absorption constants. //J.Optic. Soc. Am.-1961.-V.51.-N1.-P.35-44.
33. Novicka-Yankowska T., Gorczynska K., Michalic A., Wieteska E. Analytical visible and ultraviolet spectrometry. V.XIX.- Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo: Elsevier,-1986.-P.184-186.
34. Torsi G., Chiavari G., Lagni C. and Asmundsdottir A.M. Determination of the absolute number of moles an analyte in a flow - through system from peak - area measurements. //J.Chromatogr.-1989.-V.482.-P.207-214.
35. Torsi G., Chiavari G. and Lippolis M.T. Quantitation without calibration curves using high performance liquid chromatography with nondestructive detectors. //LC-GC.-1992.-V.5.-P.37-39.

36. Glick D., Engstrom A. and Malmstrom B.G. A critical evaluation of quantitative histo- and cyto-chemical microscopic techniques. //Science.-1951.-V.114.-P.253-258.

37. Little J.N., Fallic G.J. New considerations in detector-application relationships //J. Chromatogr.-1975.-V.112.-P.389-397.

38. Peck K. and Morris M.D. Optical errors in a liquid chromatography absorbance cell. //J.Chromatogr.-1988.-V.448.-P.193-201.

39. Kamahori M., Watanabe Y., Miyagi H., Ohki H., Miyake R. Two-dimensional viscous flow analysis in a micro flow - cell of an ultraviolet absorption detector for high - performance liquid chromatography. //J.Chromatogr.-1991.-V.549.-P.101-111.

40. Stone D.C. and Tyson J.F. Flow cell and diffusion coefficient effects in flow injection analysis. //Anal.Chim.Acta.-1986 -V.179.-P.427-432.

41. Hofmann K.and Halasz I. Mass transfer in ideal and geometrically deformed open tubes. I. Ideal and coiled tubes with circular cross - section. //J. Chromatogr.-1979.-V.173. -P.211-228.

42. Hofmann K.and Halasz I. Mass transfer in ideal and geometrically deformed open tubes. III. Deformed metal and plastic tube //J.Chromatogr. -1980.-V.199.-P.3-22.

43. Katz E.D. and Scott R.P.W. Low - dispersion connecting tube for liquid chromatography systems. //J.Chromatogr. -1983.-V.26 P.169-175.

44. Ruzicka J. and Hansen E.H. Integrated microconduits for flow injection analysis. //Anal.Chim.Acta. -1984.-V.161.-P.1-25.

45. Ruzicka J. and Hansen E.H. Chemical analysis,-V.62. Flow injection analysis.- New-York: John Willey,-1988. -P.114.

46. Engelhardt H. and Neue U.D. Reaction detector with three

- mentioned coiled open tubes in HPLC. //Chromatographia- 1982. -V.115.-N7.-P.403-408.
47. Ruzicka J. From test tube to integrated microconduits. //Anal.Chem. -1983.-V.55.-N11.-P.1040A-1053A.
48. Reijn J.H., Van der Linden W.E. and Poppe H. Dispersion in open tubes packed with large glass beads. The single bead string reactor. //Anal.Chim.Acta.-1981. -V.123. -P.229-237.
49. Leclerc D.C., Bloxham P.A., Toren G.C. Axial dispersion in coiled tubular reactors.//Anal.Chim.Acta.-1986.-V.184.-P.173-185.
50. Исии Д. Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию. -М.: Мир, -1991. -С.105.
51. Бражников В.В. Детекторы для хроматографии. -М.: Машиностроение, -1992. -С.201-202.
52. Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Мальцев В.Г. Капиллярная жидкостная хроматография. -Л.: Наука, -1987. -С.164.
53. Kucera P. Microcolumn high - performance liquid chromatography. -Amsterdam: Elsevier, -1984. -P.70.
54. Cecil T.L. and Rutan S.C. Fluorescence detection in liquid chromatography with intensified diode - array detector. //J.Chromatogr. -1991.-V.556.-P.495-503.
55. Vandernes R.J., Gooijer C., Hoonweg G.P., Brinkman U.A.T., Veethorst N.H. and Vanderbent S.J. The combination of laser - induced fluorescence and intensified linear diode - array detection in column liquid chromatography. //Anal.Lett. -1990. -V.23. -P.1235.
56. Wegrzyn J., Patonay G., Ford M. and Warner I. Unintensified photodiode array fluorescence detector for high - performance liquid chromatography. //Anal.Chem. 1990. -V.62. -P.1754.

57. Das B.S. and Thomas G.M. Fluorescence detection in high performance liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. //Anal.Chem. -1978. V.50.- N7.-P.967-973.

58. Baram G.I., Grachev M.A., Komarova N.I., Perelroyzen M.P., Bolvanov Yu.A., Kuzmin S.V., Kargaltsev V.V. and Kuper E.A. Micro-column liquid chromatography with multi-wavelength photometric detection. I. The Ob-4 micro-column liquid chromatograph. // J.Chromatogr. -1983. -V.264. -P.69-90.

59. Kalambet Yu.A., Kozmin Yu.P., Perelroyzen M.P. Computer spectrochromatography. Principles and practice of multi-channel chromatographic data processing. //J.Chromatogr. -1991. -V.542. -P.247-261.

60. Baram G.I. Portable liquid chromatograph for mobile laboratories. I. Aims. // J.Chromatogr.A. -1996. V.728. -P.387-399.