

УДК 543.545-52

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ КОМПОНЕНТОВ В СЛОЖНЫХ СМЕСЯХ НА ПРИБОРАХ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (ВЭКЭ) И ХРОМАТОГРАФАХ

© Б.Г. Беленький, Ю.В. Белов, Г.Е. Касалайнен, М.И. Медведева, В.В. Манойлов

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург.

Поступила в редакцию 9 сентября 1997 г.

Обсуждаются некоторые методики обработки электрофореграмм или хроматограмм, которые используются при качественном и количественном анализе компонентов в сложных смесях. Рассмотрены возможности предложенной методики вторичной обработки информации с использованием реперных компонентов, позволяющей значительно уменьшить погрешности определения времен выхода пиков, обеспечить возможность наглядного сравнения графиков и выделить совпадающие пики в хроматограммах и электрофореграммах. Показаны примеры использования разработанной программы и последовательности выполнения методики при анализе шестикомпонентной пробы.

ВВЕДЕНИЕ

Идентификация компонентов возможна путем сравнения параметров пиков на графиках (электрофореграммах или хроматограммах) исследуемых и калибровочных смесей. Наиболее удобно, если в приборе имеется банк данных графиков и таблиц параметров пиков смесей веществ, которые анализировались ранее. Для обеспечения сравнения результатов измерений используются реперные компоненты — вещества с известными параметрами, которые входят в состав анализируемых смесей или специально добавляются в них.

Для качественного и количественного анализа смеси веществ важна воспроизводимость результатов измерения времен миграции компонентов. Погрешности определения времен миграции зависят от различия тех условий эксперимента, за счет которых изменяются скорость электроосмотического потока и электрофоретическая подвижность компонентов. Это — состояние покрытия стенок капилляра, температура, напряженность электрического поля, состав буферного раствора и другие. Воспроизводимость результатов ухудшается после перерывов в работе [1].

Погрешности определения параметров зависят от сложности используемой методики. По мнению авторов работы [2] долговременная нестабильность времен миграции при использовании метода мицеллярной электрокинетической капиллярной хроматографии достигает 10%. В этой работе показано, что наиболее воспроизводимым является безразмерный параметр k'' , учитывающий взаимодействия исследуемого вещества с мицеллами:

$$k'' = \frac{t_r - t_o}{t_o(1 - t_r/t_{mc})},$$

где t_r — время миграции исследуемого вещества.

Из формулы видно, что для вычисления этого параметра используются два реперных пика: осмотический пик этанола с временем миграции t_o (невоздействующий с мицеллой компонент) и пик мицелл с временем миграции t_{mc} (поглощаемый мицеллой компонент). При этом погрешность измерений времени уменьшается на порядок. Недостатками такого способа сравнения можно считать специфичность параметра k'' , применение которого ограничено мицеллярной хроматографией, и отсутствие скорректированных графиков в привычном временном масштабе.

В газовой хроматографии в качестве безразмерного параметра, аналогичного k'' для качественного анализа используют индексы удерживания (индексы Ковача). При вычислении индекса Ковача в качестве реперов используют объемы удерживания двух парафиновых углеводородов, располагающихся друг за другом в гомологическом ряду [3].

В методике фирмы BECKMAN [4] для капиллярного электрофореза вычисляется безразмерный коэффициент, выраженный в процентах для качественного анализа биоорганических веществ. В числитель этого коэффициента входит разность времен миграции неизвестного соединения и отрицательно заряженного первого реперного вещества. Знаменатель представляет собой разность времен миграции нейтрального (второго реперного) и отрицательно заряженного (первого реперного) веществ. Существует ряд других подобных методик определения относительных коэффициентов для качественного анализа отдельных классов веществ на приборах определенного типа: газовых и жидкостных хроматографах и приборах капиллярного электрофореза [5]. В отличие от

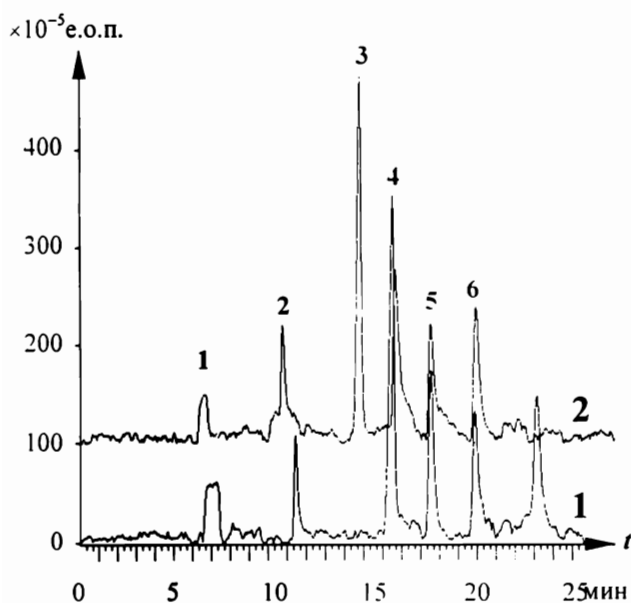


Рис. 1. Две электрофореграммы шестикомпонентной пробы. Вертикальная ось оцифрована в единицах оптической плотности (е.о.п.). Условия: капилляр — 70 см × 60 мкм, напряжение — 15 кВ, ток — 22 мкА, электролит — 0,006М Na_2HPO_4 + 0,003М $\text{Na}_3\text{B}_4\text{O}_7$, pH 7, + 0,025М ДСН; пики: 1 — ацетонитрил, 2 — гексоген, 3 — тротил, 4 — тетрил, 5 — динитротолуол, 6 — пикриновая кислота.

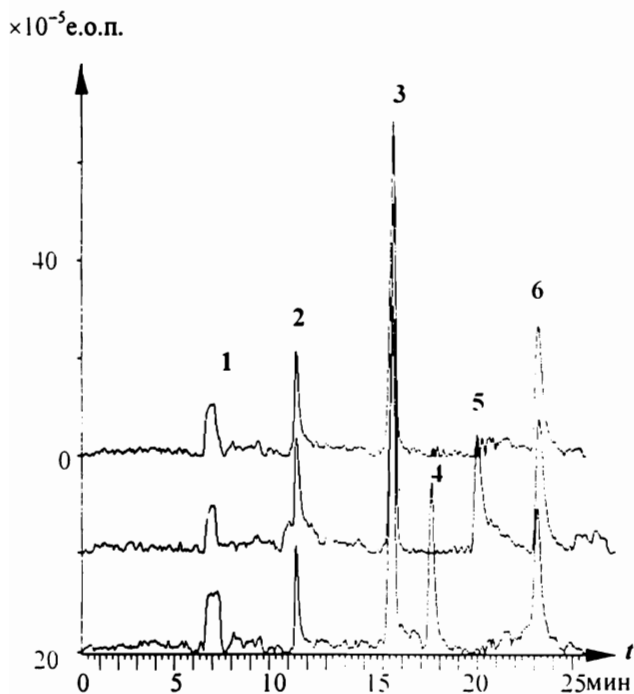


Рис. 2. Две нижние электрофореграммы имеют пики пяти компонентов. Номера пиков — прежние. Совпадающие пики совмещены. Верхний график — результат автоматического выделения пиков одноименных компонентов.

традиционных методик в данной работе для простоты интерпретации и визуализации результатов анализа вводится не безразмерный относительный коэффициент, а коэффициент, имеющий привычную для экспериментатора размерность времени.

Ниже рассмотрены возможности предлагаемой методики стандартизации хроматограмм (СХ) путем вторичной обработки информации с использованием реперных компонентов, которую можно применить с целью значительного уменьшения погрешности определения времен миграции пиков, обеспечения возможности визуального сравнения графиков и выделения совпадающих пиков. Методика позволяет преобразовать временной масштаб второй и последующих электрофореграмм таким образом, чтобы пики реперных компонентов этих электрофореграмм были совмещены с аналогичными пиками первой электрофореграммы.

Для реализации этой методики разработана полуавтоматическая программа для ЭВМ "РЕПЕР", работающая в пакете программ "НРСЕ" прибора капиллярного электрофореза "Нанофор-01" [6].

Методика СХ выполняется в следующей последовательности:

- электрофореграммы регистрируются в реальном времени в виде файла данных и индицируются в виде графиков, при этом информация об изменении оптической плотности анализируемых веществ передается с интервалом времени, кратном 1с;

- корректируются базовые линии, сглаживаются шумы и нумеруются пики всех компонентов электрофореграмм смесей веществ и определяются параметры пиков (времена миграции t , площади пиков s и другие);

- выбираются и указываются пары номеров реперных пиков n и m , которые должны быть совмещены на концах участков с номером s ;

- автоматически вычисляются калибровочные коэффициенты для корректировки масштабов для каждого участка

$$k_s = \frac{t_n - t_{n-1}}{t_m - t_{m-1}},$$

где t_n и t_{n-1} — времена миграции совмещаемых пиков с номерами n и $(n - 1)$ первой электрофореграммы,

t_m и t_{m-1} — времена миграции совмещаемых пиков с номерами m и $(m - 1)$ второй электрофореграммы, при этом начало первых участков $t_0 = 0$;

- корректируются времена выхода пиков второй электрофореграммы

$$t_k = t_{k-1} + (t_m - t_{m-1}) \times k_s,$$

где t_m и t_k — прежнее и новое время выхода каждого пика;

- корректируется второй файл данных, для этого перенумеровываются на каждом участке с но-

Таблица 1. Исходные результаты определения времен миграции t_n и t_m шести пиков компонентов первой и второй электрофореграмм.

Номера пиков	1	2	3	4	5	6	d_m %	d_c %
t_n	6,58	11,36	16,48	18,48	2083	24,08		
t_m	6,28	10,70	14,78	16,63	18,48	20,90		
t_m/t_n	0,954	0,941	0,897	0,900	0,877	0,867		
d %	4,6	5,9	10,3	10,0	12,3	13,3	13,3	9,2

Таблица 2. Результаты вычисления погрешностей d %, d_m % и d_c %.

Номера пиков	1	2	3	4	5	6		
$m = n$	d %						d_m %	d_c %
1	0	1,0	6,0	6,0	7,0	9,0	9,0	5,8
3	6,4	5,0	0	3,0	1,1	3,2	6,4	3,5
6	10,0	8,5	3,3	3,7	2,2	0	10,0	5,5
1 и 6	0	4,4	1,7	2,7	1,7	0	4,4	2,6
2 и 4	1,4	0	1,3	0	0,6	2,0	2,0	1,3
1,3 и 6	0	3,1	0	1,6	1,2	0	3,1	2,0

мером s точки съема информации второго файла, новые номера N_k образуются из старых номеров N_m

$$N_k = N_{s-1} + (N_m - N_{m-1}) \times k,$$

где N_k — ближайшее целое число,

N_{s-1} — максимальный новый номер предыдущего участка, $N_0 = 0$,

N_{m-1} — максимальный старый номер предыдущего участка;

- вычисляются новые значения площадей пиков;

- производится корреляционная обработка с целью выделения совпадающих пиков;

- с помощью программы обеспечивается индикация и печать на одном поле нескольких электрофореграмм, индикация и печать паспортов экспериментов и таблиц параметров.

В качестве примера использования разработанной программы приводим результаты обработки электрофореграмм смеси взрывчатых веществ, полученных на макете прибора высокоэффективного капиллярного электрофореза "Нанофор-01" с использованием метода мицеллярной электрокинетической капиллярной хроматографии [7].

На рис. 1 представлены две электрофореграммы, полученные в разное время. Первая условно принята в качестве калибровочной. Поскольку пики с равными номерами принадлежат одинаковым компонентам, в качестве реперных могут быть выбраны любые пики, остальные пики могут имитировать пики исследуемых веществ. Обе

электрофореграммы предварительно корректировались путем кусочно-линейной аппроксимации базовой линии и сглаживания шумов прямоугольным окном шириной 7 секунд.

В таблице 1 приводятся исходные результаты определения времен миграции t_n и t_m шести пиков компонентов первой и второй электрофореграмм, отношение времен миграции t_m/t_n , погрешности определения времен миграции каждого пика второй электрофореграммы по отношению к соответствующим пикам первой в процентах d %, максимальная d_m %, и средняя арифметическая погрешность d_c %.

В таблице 2 приведены результаты вычисления погрешностей d %, d_m % и d_c % определения времен миграций шести пиков второй электрофореграммы после ее корректировки путем совмещения ее реперных пиков с номерами m с реперными пиками первой электрофореграммы с номерами n , при этом $m = n$. Погрешность d_c % определялась для несовмещенных пиков.

В первых трех строках таблицы 2 приведены результаты совмещения одного реперного пика с номером 1, или 3, или 6 в четвертой и пятой строках — двух пиков с номерами 1 и 6, или 2 и 4, в последней строке — результаты совмещения трех пиков с номерами 1, 3 и 6.

Видно, что погрешности d_m и d_c во второй таблице зависят от расположения реперных пиков, их количества и количества участков корректировки. Минимальные погрешности получаются в случае корректировки пиков на двух участках при $m = n = 1$ и 3 и 6, а также при $m = n = 2$ и 4.

На рис.2 приведены две электрофореграммы (нижние), в которых отсутствуют 4 или 5 пики, остальные пики попарно совмещены. В результате корреляционной обработки получен верхний график, на котором выделены совпадающие пики с номерами $n = m = 1, 2, 3$ и 6, а несовпадающие пики с номерами $n = 4$ и $m = 5$ сильно подавлены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Предложенная методика стандартизации хроматограмм может быть использована для достижения основной цели: уменьшить влияние невоспроизводимости электрофореграмм на численные значения параметров пиков исследуемых веществ.

В результате применения методики СХ для анализа шестикомпонентной смеси погрешности определения времен миграции уменьшились следующим образом по сравнению с экспериментальными данными без обработки (см. табл.1 и 2):

- при использовании одного реперного пика вблизи середины временного интервала, в котором расположены пики анализируемых компонентов, максимальная погрешность измерения времен миграции уменьшилась в 2 раза, средняя — в 2,6 раза;

- при использовании двух реперных пиков максимальная погрешность уменьшилась в 6,5 раз, средняя — в 7 раз.

По сравнению с известными предложенная методика обладает следующими преимуществами:

- не ограничивает количество реперных пиков, при увеличении количества реперных пиков погрешности измерения параметров уменьшаются;

- позволяет выбрать для одного исследуемого вещества реперы, обладающие подобными электрофоретическими свойствами, в частности, пики

которых расположены рядом с пиком исследуемого вещества с одной или с двух сторон;

- обеспечивает возможность обработки как числовых значений параметров, так и графиков, приводя их к одному временному масштабу;

- позволяет визуально сравнить и совместить несколько электрофореграмм на одном графическом изображении;

- обеспечивает создание в приборе банка данных не только в виде таблиц параметров, но и в виде файлов графиков в одном временном масштабе;

- позволяет автоматически выделить на электрофореграммах сложных смесей пики одноименных компонентов с помощью корреляционной обработки, методика которой в настоящее время разрабатывается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по капиллярному электрофорезу. 1996. Научный совет РАН по хроматографии. М. 231с.
2. Northrop D.M., Martire D.E., //Anal.Chem. 1991. V. 63. P.1038–1042.
3. Пецев Н., Коцев Н. Справочник по газовой хроматографии 1987. М. МИР. 260с.
4. European Patent. 1992. №0518476. G01N 27/26.
5. Muijselaar Pim G.H.M., Claessens Henk A., and Cramers Carel A. //Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 635–644.
6. Беленький Б.Г., Белов Ю.В., Касалайнен Г.Е. //Ж. Анал. Хим. 1996. Т.51, N 8. С. 817–834.
7. Беленький Б.Г., Белов Ю.В., Касалайнен Г.Е., Медведева М.И., Хор С.Т. //Ж. Анал. Хим. 1998. Т.53, № 3. С. 329–333.

IDENTIFICATION OF COMPONENTS IN COMPLEX MIXTURES USING INSTRUMENTS FOR HIGH PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS (HPCE) AND CHROMATOGRAPHS

B.G. Belen'kii, Yu.V. Belov, G.E. Kasalainen, M.I. Medvedeva, V.V. Manoilov

Institute for Analytical Instrumentation RAS, St.Petersburg

Some methods for off-line electrophoregrams and chromatograms processing have been discussed. These methods could be used for qualitative and quantitative analysis of components in complex mixtures. They allow the user to considerably reduce errors in determination of retention times by using reference peaks, to visually compare graphic information and to resolve overlapping peaks in chromatograms and electrophoregrams. The examples of the developed software applications and the protocol for the method in analysis of six component mixtures are presented.