

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ»

На правах рукописи

Кулябина Елена Валериевна

**Разработка и исследование метрологического обеспечения метода
идентификации и количественного определения сложных органических
соединений на основе использования комплекса веществ с
унифицированными хроматографическими и спектральными
параметрами**

Специальность 05.11.15 «Метрология и метрологическое обеспечение»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель
кандидат химических наук
Рутенберг Ольга Липовна

Научный консультант
доктор химических наук
Барам Григорий Иосифович

Москва, 2013

Содержание

Введение	4
Глава 1. Литературный обзор и анализ современных методов идентификации, состояния метрологического обеспечения количественного определения содержания сложных органических соединений с помощью ВЭЖХ и хроматографических баз данных	11
Глава 2. Определение параметров хроматографа, вносящих доминирующие вклады в погрешность определения содержания анализируемого вещества в пробе	32
Глава 3. Результаты теоретических и экспериментальных исследований веществ – кандидатов в компоненты тестовой смеси	41
3.1. Выбор вещества-маркера свободного объема хроматографической колонки	41
3.2. Выбор вещества-маркера качества упаковки колонки	45
3.3. Выбор вещества для контроля инжектора	46
3.4. Выбор вещества-маркера точности установки длин волн УФ детектора	47
3.5. Выбор маркера линейного диапазона детектора	55
3.6. Выбор вещества-маркера работы насосов	57
3.7. Контроль значения рН элюента и обоснование выбора вещества маркера	59
3.8. Выбор вещества для контроля работы смесителя	67
Глава 4. Исследование тестовой смеси веществ «БД-2012»	69

Глава 5. Разработка и аттестация методики идентификации и количественного определения УФ поглощающих веществ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	77
5.1. Методика идентификации и количественного определения УФ поглощающих веществ	77
5.2. Источники ошибок идентификации и минимизация их влияния путем применения тестовой смеси	82
Глава 6. Оценка достоверности идентификации	85
6.1. Теоретические аспекты идентификации	85
6.2. Определение вероятностей ошибок первого и второго рода	88
6.3. Определение достоверности идентификации по экспериментальным данным	97
6.4. Применение критерия Стьюдента для определения статистических оценок интегральной характеристики набора спектральных отношений	101
Глава 7. Процедура корректировки базы данных	108
Заключение	115
Литература	118
Приложение. Методика приготовления аттестованной смеси «БД-2012» и установления спектральных и хроматографических параметров, воспроизводимых компонентами смеси	129

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) широко применяется для идентификации и определения содержания сложных органических соединений

- в биотехнологиях для исследования биологических объектов;
- в пищевой промышленности для определения состава и содержания пищевых добавок, консервантов, красителей, вводимых в детское питание, напитки, в молочные продукты;
- в фармацевтике для подтверждения соответствия действительного количества вещества регламентированному в нормативных документах;
- в медицине – для определения в биологических жидкостях допингов (актуально для спортсменов), наркотических веществ, алкоголя (при освидетельствовании водителей);
- в судебно-медицинской экспертизе для идентификации токсинов при определении причины отравления;
- в области охраны окружающей среды для мониторинга содержания загрязняющих веществ в выбросах промышленных предприятий, водоемах, почвах и других объектах, прогнозирования состояния окружающей среды, предотвращения её загрязнения.

Для решения перечисленных задач существует большое количество хроматографических методик измерений содержания веществ с использованием жидкостных хроматографов с различными детекторами, колонками, сорбентами. Самым распространенным вариантом ВЭЖХ в последние 15-20 лет является обращено-фазовая жидкостная хроматография с детектированием по поглощению ультрафиолетового излучения.

Разработкой метрологического обеспечения высокоэффективной жидкостной хроматографии занимались отечественные ученые, такие как

Г.И. Барам, С.С. Барсегян, В.И. Вершинин, И.Г. Зенкевич, Ш.Р. Фаткудинова и др.

Аналитические задачи, решаемые методом ВЭЖХ, можно разделить на два типа.

1. Определение одного или нескольких веществ на хроматографе, предварительно отградуированном по стандартным образцам этого вещества (веществ).

2. Определение одного или нескольких веществ из большой группы соединений, любое из которых может присутствовать в пробе, используя для идентификации веществ информацию, собранную и систематизированную в заранее сформированную базу данных (БД).

Решение аналитических задач первого типа – традиционных задач – связано с некоторой громоздкостью хроматографической процедуры. Причина того, что ВЭЖХ-анализ является весьма трудоемким и медленным заключается в том, что практически всегда при переходе от анализа одного вещества к другому хроматограф надо существенно перестраивать: заменять колонку и элюенты, изменять режимы работы насосов и детектора.

Задачи метрологического обеспечения традиционных хроматографических измерений сформулированы и в значительной степени решены. Хроматографы являются индивидуально градуируемыми средствами измерений. Метрологические характеристики для них при выпуске из производства нормируют в соответствии с МИ 137-77 по типовым веществам в регламентированных производителем приборов условиях. В этих же условиях хроматографы поверяют в соответствии с ГОСТ 8.772-2011.

При использовании хроматографов для решения конкретной аналитической задачи метрологические характеристики устанавливают при аттестации методики измерений в соответствии с ГОСТ 8.563-09 в условиях эксплуатации с использованием образцов для градуировки, предусмотренных методикой. Повышение точности таких измерений связано с уменьшением

погрешности градуировки, увеличением числа градуировочных растворов и уменьшением временного периода между градуировками. Трудоемкость и стоимость таких анализов при этом ещё больше увеличивается. При отсутствии стандартных образцов или их недоступности выполнять анализ сложных органических веществ традиционным методом ВЭЖХ в большинстве случаев невозможно.

Решение задач второго типа стало возможным в результате интенсивного развития различных разделов ВЭЖХ в конце 70-х годов прошлого столетия, когда возникли предпосылки к проведению анализа больших групп веществ в рамках одной методики, и появилась возможность идентификации веществ с использованием баз данных.

Суть таких методик, называемых скрининговыми, заключается в быстром анализе большого числа веществ и их «просеивании» с целью выявления небольшого набора предварительно известных возможных веществ-кандидатов. Такие методики предполагают отказ от традиционных способов градуировки за счет того, что параметры хроматографа контролируют с использованием смеси веществ – маркеров, выполняющей функции стандартного образца. В этом случае необходимы иные средства и методы метрологического обеспечения, чем для традиционных методик. Это связано с тем, что при определении количественного содержания вещества в пробе по традиционной методике, отсутствует необходимость идентифицировать вещество, т.к. прибор отградуирован по этому веществу. При использовании скрининговых методик анализа с применением баз данных основная задача состоит в достоверной идентификации, которая невозможна без контроля параметров хроматографа. Это касается всех составляющих хроматографической системы: детектора, насоса, состава подвижной фазы, колонки, инжектора.

Для решения таких задач необходимо усовершенствование существующих методов и разработка новых средства контроля метрологических характеристик хроматографов, его спектральных

параметров, позволяющих сократить трудоемкость и длительность хроматографического процесса; разработка методик определения достоверности идентификации и количественного определения веществ с использованием хроматографических баз данных.

Цель и основные задачи работы

Целью диссертационной работы является разработка и метрологические исследования метода идентификации и количественного определения органических соединений с применением высокоэффективного жидкостного хроматографа с УФ детектором, разработка процедуры контроля параметров хроматографа с использованием комплекса веществ с унифицированными хроматографическими и спектральными параметрами.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие научные задачи.

1. Выбрать параметры хроматографа, влияющие на достоверность идентификации и количественное определение органических соединений.
2. Выбрать на основании экспериментальных исследований вещества-маркеры, позволяющие наиболее эффективно контролировать хроматографические и спектральные параметры хроматографа: свободный объем колонки, точность настройки длины волны УФ детектора, отклонение градиента элюирования от заданной формы, линейность детектора, отклонение состава элюента от заданного.
3. Разработать процедуру приготовления и аттестации тестовой смеси на основе выбранных веществ-маркеров.
4. Разработать процедуру контроля хроматографических и спектральных параметров хроматографа с использованием тестовой смеси веществ с унифицированными параметрами.

5. Разработать методику идентификации и количественного определения органических веществ с применением высокоэффективного жидкостного хроматографа с УФ детектором.

6. Разработать процедуру оценки достоверности идентификации.

Методы и средства исследований

Экспериментальные исследования выполнены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для приготовления и аттестации тестовой смеси использован гравиметрический метод.

Аттестация методики измерений массовой концентрации УФ-поглощающих веществ выполнена по результатам межлабораторного эксперимента.

Методы математической статистики и теории вероятностей применены для оценки достоверности идентификации.

Научная новизна работы заключается в следующем.

1. Впервые обоснован на основании экспериментальных исследований выбор веществ-маркеров для контроля хроматографических и спектральных параметров хроматографа: свободного объема колонки, точности настройки длины волны УФ детектора, отклонения градиента элюирования от заданной формы, линейности детектора, отклонения состава элюента от заданного.
2. Разработана процедура приготовления и аттестации «тестовой смеси БД-2012» на основе выбранных веществ-маркеров.
3. Разработана процедура контроля хроматографических и спектральных параметров хроматографа с использованием тестовой смеси веществ с унифицированными параметрами.

4. Разработана методика идентификации и количественного определения УФ-поглощающих веществ методом жидкостной хроматографии.
5. Впервые оценена достоверность идентификации веществ, проведенной в соответствии с разработанной процедурой.

Практическая значимость работы

– Разработана методика идентификации и измерения массовой концентрации органических веществ.

– Разработанная методика приготовления и аттестации тестовой смеси веществ с унифицированными хроматографическими и спектральными параметрами для контроля параметров хроматографа, внедрена на предприятиях и в организациях г. Москвы, г. Новосибирска, г. Якутска, что подтверждается соответствующими актами о внедрении (НП «Фармгильдия», г. Москва, ЗАО ИХ «ЭкоНова», г. Новосибирск, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения РАН, г. Якутск, ООО «Нордэласт», г. Якутск).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Выбранные в результате проведенных исследований параметры хроматографа, обеспечивают достоверность идентификации и количественного определения органических соединений.

2. Выбранные на основе экспериментальных исследований вещества-маркеры и разработанная на их основе тестовая смесь позволяют наиболее эффективно контролировать конкретные параметры хроматографа.

3. Разработанная методика идентификации и количественного определения содержания органических веществ дает возможность проводить количественное определение идентифицированных веществ без применения традиционной градуировки.

4. Проведенная оценка достоверности идентификации показывает достаточность значений объема удерживания и спектральных отношений для идентификации веществ.

Глава 1

Литературный обзор и анализ современного состояния существующих методов идентификации, метрологического обеспечения и количественного определения содержания органических соединений с помощью ВЭЖХ и хроматографических баз данных

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) как метод химического анализа появилась 40 лет назад и быстро заняла в аналитической химии ведущее место [1-3]. Это произошло благодаря нескольким причинам. Метод ВЭЖХ пригоден для определения веществ в очень большом диапазоне молярных масс – от нескольких единиц до десятков миллионов. Почти все разделения можно проводить при температуре, близкой к комнатной, что позволяет применять этот метод для анализа нестабильных при повышенных температурах веществ, в частности физиологических жидкостей, биологически активных веществ и биополимеров. Эффективность разделения ВЭЖХ существенно превосходит эффективность газовой хроматографии, скорость разделения методом ВЭЖХ также достаточно высока (несколько минут для разделения сложной смеси); ВЭЖХ дает возможность выделять в мягких условиях чистые вещества из сложной смеси с возможностью последующего исследования другими физико-химическими методами [4].

Таким образом, ВЭЖХ в отличие от других аналитических методов (газовой хроматографии, капиллярного электрофореза) может применяться для анализа практически всех соединений: летучих и нелетучих, низко- и высокомолекулярных, несущих заряд и незаряженных, термостабильных и термолабильных.

Существует большое количество хроматографических методик измерений содержания веществ с использованием жидкостных хроматографов с различными детекторами, колонками, сорбентами. В

последние 15-20 лет самым распространенным вариантом ВЭЖХ является обращено-фазовая жидкостная хроматография (неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная) с детектированием по поглощению ультрафиолетового излучения.

В пользу использования УФ-спектрофотометрического детектирования в комплексе с ВЭЖХ говорит тот факт, что результатом исследований сферы и диапазона применения этого метода анализа появилось практическое доказательство его высокой селективности, вполне сравнимой с селективностью методов ГХ-МС и ЖХ-МС-МС [5-7]. Учитывая тот факт, что хроматографы с УФ-спектрометрическими детекторами существенно проще, надежнее и дешевле хроматографов с МС-детекторами, можно заключить, что применение ВЭЖХ-УФ как направление развития аналитической химии будет только расширяться и совершенствоваться.

Для современных аналитических ВЭЖХ систем характерны следующие параметры [8 - 10]:

- диаметр зерна адсорбента – $(3 \div 5)$ мкм;
- основа адсорбента – сферический объемно-пористый силикагель;
- размер пор адсорбента – $(10 \div 30)$ нм;
- площадь поверхности адсорбента – $(200 \div 400)$ м²/г;
- прививаемый к силикагелю радикал – октадецил (С18);
- диаметр хроматографической колонки $(3,0 \div 4,6)$ мм;
- длина колонки – $(100 \div 150)$ мм;
- долговечность колонки – до 1000 и более анализов;
- давление – $(8 \div 15)$ МПа;
- тип насоса – двухплунжерный;
- детектор – спектрофотометр (работающий в диапазоне $(190 \div 360)$ или $(190 \div 800)$ нм)

Потребительские свойства современной ВЭЖХ можно свести к таким характеристикам как:

- продолжительность анализа – $(20 \div 40)$ мин;

- пиковая емкость колонки – $(50 \div 100)$ пиков;
- чувствительность анализа – 1 нг/пик.

Как и другие инструментальные методы химического анализа, ВЭЖХ развивается, и главным направлением развития является движение в сторону повышения эффективности. Термин "высокая эффективность метода" является весьма условным, т.к. четкую границу между "низкой", "высокой" и "сверхвысокой" эффективностью провести трудно, хотя такие типы жидкостной хроматографии существуют с терминологической точки зрения вполне официально. Мерой эффективности можно считать скорость выполнения анализа. Так, при низкой эффективности скорость анализа составляет примерно 1 вещество в час, при высокой эффективности – 1 вещество в минуту, при сверхвысокой эффективности – 1 вещество в 1-10 секунд.

Сверхвысокоэффективная ЖХ (СВЭЖХ) и сверхбыстрая ВЭЖХ появились в 2004 г. [11]. В отличие от ВЭЖХ, анализ методом СВЭЖХ осуществляется на колонках, заполненных адсорбентами с размером зерен $(1,7 \div 2,0)$ мкм. Трехкратное уменьшение диаметра зерна адсорбента повышает оптимальную линейную скорость движения подвижной фазы с 1-2 до 10 мм/сек, но элюирование при такой скорости требует повышения давления в 5-10 раз. Так как насосы в коммерчески доступных хроматографах не могут пока работать при давлениях выше 100-150 МПа, сверхбыстрые разделения осуществляют на колонках, длина которых составляет $(20 \div 30)$ мм. Очевидно, что пиковая емкость таких коротких колонок, даже заполненных микрочастицами $((1,7 \div 2,0)$ мкм) адсорбентами, не превышает 50 пиков. Следует отметить ещё одно обстоятельство, затрудняющее применение СВЭЖХ в повседневной практике. Оно связано с тем, что ускорение разделения требует адекватного ускорения работы детектора [12], что представляет собой непростую задачу.

Ускорение хроматографического анализа путем перехода от ВЭЖХ к СВЭЖХ, пока заметно сдерживается техническими трудностями, главными из которых являются:

- необходимость разработки хроматографических колонок специальной конструкции и специальных приемов работы, включая методики упаковки колонок адсорбентами с субмикронными размерами частиц;

- применение при повышенном давлении (до 100-150 МПа) специальных материалов и изготовление с повышенной точностью подвижных узлов хроматографа для предотвращения потери герметичности в процессе эксплуатации. По этой причине хроматографы, работающие при давлениях более 150 МПа [13, 14], пока коммерчески не доступны;

- применение быстрых детекторов для ускорения анализа [12].

Независимым способом повышения скорости проведения анализа методом ВЭЖХ является путь, связанный с сокращением продолжительности всей аналитической процедуры за счет таких действий, как:

- сокращение продолжительности подготовки проб;
- круглосуточная эксплуатация хроматографа;
- проведение анализа в оптимизированных условиях;
- сокращение продолжительности градуировки хроматографа.

Проведение традиционных ВЭЖХ-анализов связано с трудоемкостью, вызванной необходимостью перестройки хроматографа при переходе от анализа одного вещества к другому, что влечет за собой довольно большие временные затраты, требует привлечения большого числа реактивов, выполнения промежуточных операций. Очевидно, что определение веществ методом ВЭЖХ "каждому веществу – своя методика анализа", лежащее в основе многих методологий, является не самым быстрым и, возможно не оптимальным. Единственным исключением из этого "правила" является

анализ аминокислот, выполняемые по методикам, единым для определения 20-ти и более аминокислот [16].

В результате интенсивного развития жидкостной хроматографии появились предпосылки к проведению анализа больших групп веществ в рамках одной методики. При таком подходе появляется необходимая «гибкость» процесса хроматографирования, связанная с возможностью быстрой идентификации с использованием базы данных. Развитие этого направления ВЭЖХ особенно важно в области судебной медицины для проведения систематического токсикологического анализа (СТА) [17-20]: быстрого определения в тканях организма вещества-токсина. Вероятных кандидатов могут быть сотни, и последовательный их перебор с применением большого числа разных методик будет занимать много времени, а учитывая, что для определения каждого вещества требуются свои условия, элюенты, то такой анализ будет еще и довольно дорогостоящим.

Скрининговые методики анализа, к которым относится систематический токсикологический анализ, основаны на использовании баз данных, созданных с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием по ультрафиолетовому поглощению (далее БД ВЭЖХ-УФ), имеют преимущества, которые трудно переоценить, но требования, предъявляемые к их метрологическому обеспечению, во много раз выше, чем для традиционных методик. Это связано с тем, что при определении количественного содержания вещества в пробе по традиционной методике, отсутствует необходимость идентифицировать вещество, т.к. прибор отградуирован по этому веществу. При использовании скрининговых методик анализа с применением БД ВЭЖХ-УФ основная задача состоит в достоверной идентификации, которая обеспечивается контролем параметров хроматографа. Важны не только сами значения характеристик, но и такие факторы как

– стабильность метрологических характеристик во времени;

- возможность оперативной проверки пригодности хроматографа для выполнения анализов с применением БД ВЭЖХ-УФ;
- возможность использования градуировочных характеристик, полученных на одном экземпляре хроматографа, на другом экземпляре.

Классический метод идентификации и количественного определения веществ, осуществляемый с помощью ВЭЖХ, основан на принципе – каждому анализируемому веществу – своя методика анализа. Применяя такой подход, определяют одно вещество или смесь известных веществ на хроматографе, предварительно отградуированном по стандартным образцам этих веществ. Периодичность градуировки зависит от требований к стабильности параметров хроматографа при проведении конкретного анализа, устанавливают её при разработке и аттестации методики измерений таким образом, чтобы изменения градуировочной характеристики были незначимы на фоне погрешности измерений. Отклонение градуировочной характеристики от установленной проверяют, применяя процедуру контроля её стабильности.

Градуировка включает в себя тщательно проводимые подготовительные работы: установку колонки с соответствующим анализу сорбентом, подготовку необходимых элюентов, настройку режимов работы насосов, инжектора, детектора, термостата, подготовку стандартных образцов анализируемых веществ, работы по промывке всей хроматографической системы перед проведением анализа соответствующими растворами и собственно получение градуировочной характеристики. Таким образом, бóльшая часть времени анализа затрачивается на градуировку хроматографа. При переходе от анализа одного вещества к анализу другого, хроматограф снова требуется перенастраивать (заменять колонку, элюенты и т.д.), а затем градуировать по соответствующим стандартным образцам. Так, продолжительность определения нескольких примесей в фармакопейной субстанции "Ампициллин" по требованиям соответствующих монографий

Британской и Европейской Фармакопей при точном соблюдении методики превышает 18 часов [21].

При анализе веществ, стандартные образцы которых дороги, труднодоступны или требуют специальных лицензий для проведения работ (например – стандартные образцы сильнодействующих лекарственных препаратов, токсичных веществ, наркотиков), идентификация и количественное определение при помощи классического подхода становится практически неосуществимой.

Для идентификации таких веществ существует другой, оптимальный для ее решения, метод анализа – определение большой группы веществ по одной методике анализа [22]. Этот принцип заключается в анализе одного или нескольких веществ из большой группы соединений (любое из которых может присутствовать в пробе), используя для идентификации веществ информацию, собранную и систематизированную в заранее сформированную базу данных. Таким примером является систематический токсикологический анализ. Веществ-токсинов, которые могут быть причиной смерти, известно много сотен, и последовательный их перебор в поисках целевого соединения с применением большого числа разных методик, очевидно, невозможен.

В пользу применения ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектированием для СТА говорит тот факт, что применение этого метода дает возможность избежать появления одной из основных причин ошибок в хроматографическом анализе – неправильной идентификации веществ при одновременном выходе из хроматографической колонки двух различных веществ. Ошибочные выводы могут быть сделаны при интерференции спектров двух веществ, суммарный спектр которых имитирует УФ-спектр известного соединения или их суммарный спектр не соответствует ни одному известному спектру из базы данных. Поэтому перед началом поиска соответствия спектра известному спектру, содержащемуся в базе данных, проверяют чистоту интересующего пика. Современное программное

обеспечение позволяет разделить пики одновременно выходящих веществ по их УФ-спектрам и идентифицировать каждое вещество в отдельности [23].

Успешное внедрение ВЭЖХ в СТА в виде единой для многих веществ методики определения стало возможным благодаря трем главным факторам:

- применению обращено-фазовой хроматографии как способа разделения большого числа веществ, значительно различающихся по полярности;

- применению многоволнового УФ-детектирования, позволяющего идентифицировать вещества на хроматограмме не только по значению их удерживания, но и по их спектральным характеристикам; совместное использование в одной БД параметров удерживания и спектральных характеристик вещества дает возможность в процессе его идентификации значительно уменьшить границы поиска соответствия характеристик неизвестного вещества данным, находящимся в базе;

- применению программного обеспечения, необходимого для хранения хроматографических и спектральных параметров анализируемых веществ – БД ВЭЖХ-УФ, а также для математической и статистической обработки хроматограмм с целью получения количественных результатов анализа.

Первые опубликованные методики были ещё весьма несовершенны и базы данных содержали параметры лишь нескольких десятков веществ, но методики последнего десятилетия охватывают уже многие сотни соединений. Работы последнего десятилетия убедительно показывают перспективность использования баз хроматографических и спектральных данных, которые обеспечивают надежность получаемых результатов идентификации и определения содержания веществ [7, 20, 24-28].

Многолетний опыт работы большого числа аналитических лабораторий показывает, что ВЭЖХ с спектрофотометрическим детектором надежный, понятный и воспроизводимый метод для идентификации веществ в клинической, а также судебной токсикологии, имеющий, что немаловажно, сравнительно простую пробоподготовку [20].

Краткие характеристики основных баз данных, содержащих УФ-спектры, используемые для целей идентификации веществ приведены в хронологическом порядке в таблице 1.1.

Таблица 1.1.

Перечень БД, предназначенных для решения скрининговых задач
методом ВЭЖХ-УФ

Источники	Анализируемые вещества	Колонка	Детектор	Показатели точности, приведенные в БД	
				σ_r , %	σ_R , %
1	2	3	4	5	6
Baker <i>et al.</i> , 1979 [34]	101 сильно-действующих лекарств	1. Ø3,9 x 300 мм, µBondapak C18 (10 мкм) - Waters 2. Ø3,9 x 300 мм, µPorasil (10 мкм) - Waters 3. Ø3,9 x 300 мм, µPorasil (10 мкм) - Waters	254 и 280 нм (два последовательно соединенных детектора)	-	-
Jinno <i>et al.</i> 1990 [35]	65 сильно-действующих лекарств	Ø4,6 x 250 мм, Finerack C18S (5 мкм) - Jasco	Детектор на диодной матрице (далее - ДМД) Jasco Multi-320; 195-350 нм; спектр с шагом 5 нм	-	-

Таблица 1.1. (продолжение)

1	2	3	4	5	6
Bogusz, Wu, 1991 [29]	225 сильно-действующих лекарств и пестицидов	Ø4 x 125 мм, Superspher 10 RP-18 (4 мкм) - Merck	ДМД Hewlett-Packard 1040A Series; 220-400 нм; спектр с шагом 2 нм.	0,7- 2,0	-
Puopolo <i>et al.</i> , 1991 [36]	15 бензодиазепинов	Ø3.9 x 150 мм, Novapak C18 (4 мкм) – Waters	ДМД Waters 990+. 210-340 нм	-	-
Koves, 1995 [17]	272 сильно-действующих лекарств	1. Ø4.6 x 250 мм, Supelcosil LC-DP (5 мкм) – Supelco 2. Ø4 x 250 мм, LiChrospher RP-8 (5 мкм) – Merck 3. Ø3.9 x 150 мм, Nova-Pak Phenyl (5 мкм) - Waters	ДМД Varian Model 9065; 210-367 нм; спектр с шагом 2 нм	-	-
Maier, Bogusz, 1995 [5]	372 сильно-действующих лекарств и пестицидов	Ø4 x 125 мм, Supersher 10 RP-18 (4 мкм) - Merck	ДМД Waters Type 990; 190-800 нм	-	-
Зенкевич и др., 1996 [37]	23 наркотических вещества	Ø3,9 x 300 мм, µBondapak C18 (10 мкм) – Waters	Waters 490. 254, 220, 246 и 280 нм	-	-

Таблица 1.1. (продолжение)

1	2	3	4	5	6
Gaillard, Pepin, 1997 [24]	684 сильно- действующих лекарств и пестицидов	Ø4.6 x 250 мм, Symmetry (5 мкм) – Waters	ДМД Waters Type 996; 200-350 нм; спектры с разрешением 1.2 нм	-	-
Elliot, Hale, 1998 [28]	Более 250 сильно- действующих лекарств	Ø4,6 x 150 мм, Spherisorb S5 OD/CN – Phase Sep.	ДМД Gynkotek UVD340S 200-595 нм	-	-
Liu <i>et al.</i> , 2001 [38]	266 фармакопейных субстанций, токсичных соединений	Ø4,6 x 200 мм, Lichrosorb RP 18 (10 мкм) – Merck	ДМД Agilent 1100 System 200-400 нм	0-17	5
Pragst, Herzler <i>et al.</i> , 2003 [7]	2682 токсичных вещества	Ø4 x 250 мм, Lichrospher-RP8ec (5 мкм) – Merck	ДМД 1. Shimadzu SPD- M10Avp. 2. Bio-Tek 540. 3. Hewlett- Packard 1090 Series II	0,5	0,8

Таблица 1.1. (окончание)

1	2	3	4	5	6
Nielsen, Smedsgaard, 2003 [33]	474 микотоксина и метаболита	Ø2 x 125 мм, Hypersil BDS-C18 (3 мкм) – Agilent	ДМД Agilent 1100 System 200-700 нм; спектры с разрешением 4 нм	0,7	1,0
Stoll <i>et al.</i> , 2006 [39]; Porter <i>et al.</i> , 2006 [40]	47 сильно-действующих лекарств	Ø2,1 x 125 мм, SB-C18 (5 мкм) – Agilent Xterra MS-C8 (5 мкм) – Waters	ДМД Hewlett-Packard 1040 Series; 220-400 нм	-	-
Grobosch <i>et al.</i> TOX.I.S. 2007 [41]	2600 терапевтически х лекарств, наркотики, метаболиты		ДМД	7,2	8,0
Барам Г.И. и др., 2006 [27]	500 наркотиков, лекарств, пестицидов и других веществ	Ø2 x 75 мм, ProntoSIL-120-5-C18 AQ (5 мкм) – ЗАО "Эконова"	Миличром А-02 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм	1,4	3,5
Zhang <i>et al.</i> , 2011	61 сильно-действующее лекарство	Ø4,6 x 250 мм, TC-C18 (5 мкм) - Agilent	ДМД Beckman Coulter Series 168. 200 – 364 нм	-	-

В большинстве случаев в качестве параметров удерживания были использованы время удерживания и относительное время удерживания стандартного соединения с поправкой на мертвое время. М. Богуш и др. [29] и С. П. Эллиот и К.А. Хейл [28, 30, 31], использовавшие систему индексов удерживания для градиентной системы ВЭЖХ на основе нитроалканов или кислых и основных стандартных веществ, смогли увеличить повторяемость результатов.

Одним из показательных примеров такой базы данных является разработанная Матиасом Херцлером, Сиглинд Герр и Фрицем Прастом база хроматографических и спектральных данных 2682 соединений [7]. С помощью этой БД также был исследован вопрос селективности метода ВЭЖХ с детектором на диодной матрице (далее ДМД) для идентификации веществ. В базу данных были включены наборы УФ-спектров, относительных времен удерживания и структурных формул. Спектры и времена удерживания были измерены при изократических условиях в растворе ацетонитрила и фосфатного буфера (рН 2,3). Такой состав подвижной фазы широко используется в фармакологическом и токсикологическом анализах.

Для включения в базу данных были выбраны вещества из всех областей токсикологии и фармакологии. В рассмотрение были включены все группы лекарственных средств наиболее часто применяемые в фармакологии.

Каждое соединение анализировали с использованием трех хроматографических систем с детектором на диодной матрице (ВЭЖХ-ДМД): Shimadzu HPLC; Bio-Tek HPLC; Hewlett-Packard (Agilent) HPLC - HP 1090 Series II. Градуировку и проверку точности установки длины волны проводили постоянно.

Селективность ВЭЖХ-ДМД системы определяли следующим образом. Высокая селективность УФ-спектров для идентификации веществ означала, что спектр каждого соединения может быть однозначно определен в

присутствии других соединений, случайно выбранных из окружения исследуемого вещества. Предпосылкой правильной идентификации является характерная зависимость спектра от химической структуры анализируемого вещества.

Известно, что присутствие в молекуле анализируемого вещества хромофора является определяющим фактором идентификации по УФ-спектру. В случае присутствия нескольких хромофоров УФ-спектр молекулы является примерно суммой спектров этих нескольких хромофоров. Структурная часть молекулы, участвующая в УФ-поглощении (один или несколько изолированных хромофоров), называется системой поглощения. 2560 из 2682 соединений определены как вещества, поглощающие излучение в УФ-диапазоне. Остальные 122 случая (насыщенные вещества или неорганические анионы) имеют другую природу поглощения в ультрафиолетовом диапазоне.

Результаты анализа сходных спектров, принадлежащих различным веществам, указанной базы данных позволяют сделать вывод, что структурно разные системы поглощения почти всегда можно отличить друг от друга по их УФ-спектрам. По крайней мере 1370 соединений (53,5 %), обладающих уникальными системами поглощения, обладают уникальными УФ-спектрами. С другой стороны, различные соединения с различными хромофорами, или системами поглощения, могут давать аналогичные спектры. Однако из-за электронных эффектов остальной молекулы почти всегда можно найти спектральные различия или для окончательной идентификации использовать другие методы анализа.

Описанная выше база данных UVTOX [32], состоящая из 2682 веществ получила развитие и к настоящему времени насчитывает 3270 веществ.

При помощи базы данных UVTOX появляется возможность быстрого определения в судебном и токсикологическом анализе неизвестных веществ из известного обширного списка возможных кандидатов.

Например, при анализе причин отравления человека неизвестным количеством неизвестных веществ по результатам анализа образца крови была получена хроматограмма с 7 явными пиками, из которых 5 были идентифицированы по их УФ спектрам и временам удерживания как кофеин, хлордиазепоксид, фенobarбитал, демокзепам, напроксен [32]. На рисунке 1.1 показана хроматограмма образца крови на длине волны 225 нм. На рисунке 1.2 –УФ спектры пиков 2,4 и 6. Спектр пика 6 не найден в базе данных и имеет характеристики неизвестного метаболита хлордиазепоксида. Пик 5 является пиком матрицы и часто встречается при ВЭЖХ-ДМД анализе.

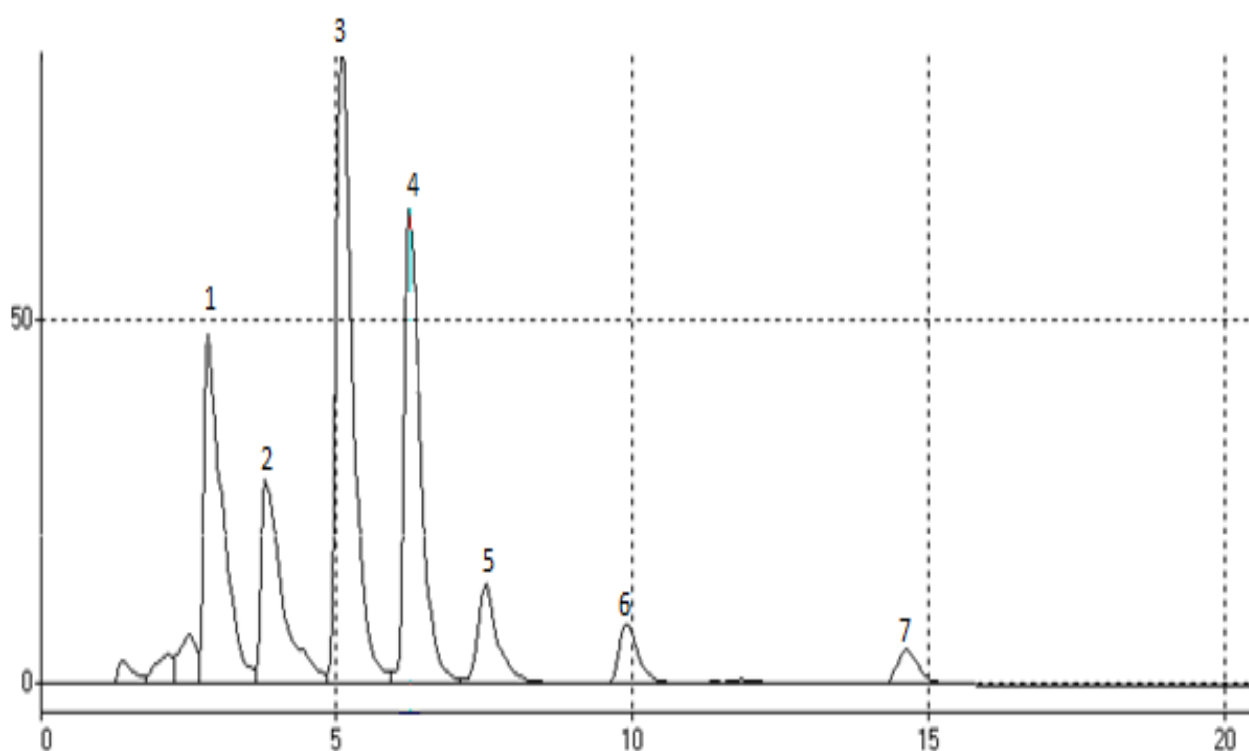
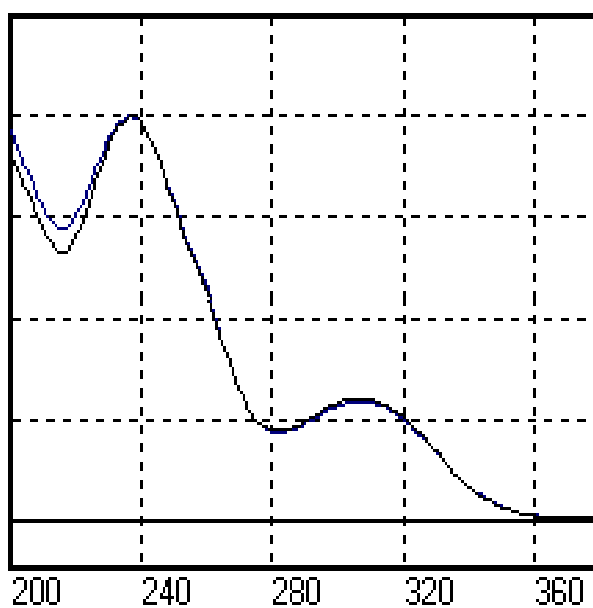
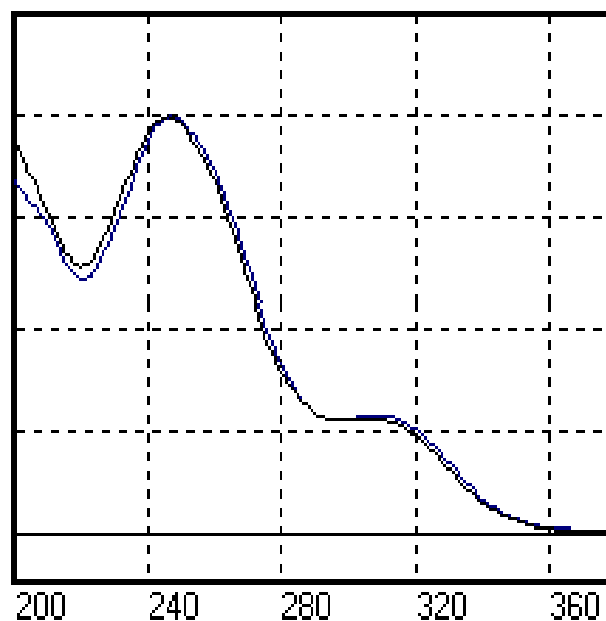


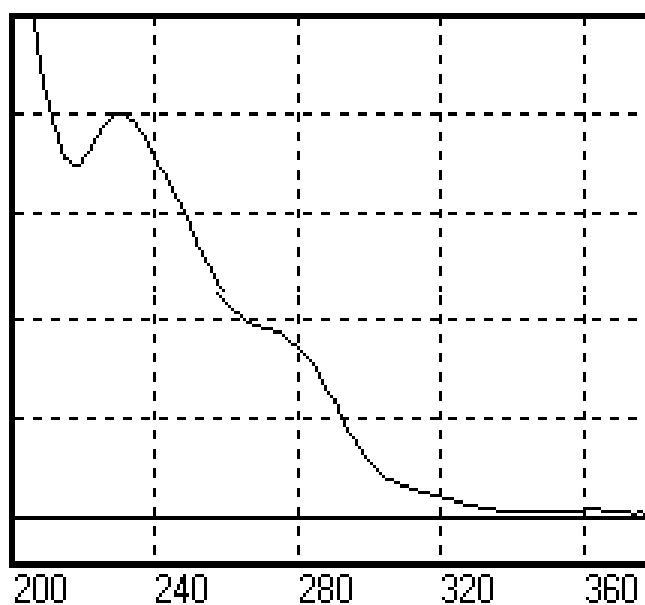
Рисунок 1.1. Хроматограмма образца крови [32]



Спектр пика 2 (хлордiazепоксид)



Спектр пика 4 (демокzепам)



Спектр пика 6 (метаболит хлордiazепоксида)

Рисунок 1.2. Пики 2, 4, 6

Другим интересным примером базы хроматографических и спектральных данных является БД, содержащая характеристики 474 микотоксинов и метаболитов грибов [33].

Микроскопические грибы являются богатым источником химического разнообразия, а вместе с актиномицетами они являются источником более 50 % метаболитов, используемых в фармацевтической промышленности, либо соединений, используемых в натуральном виде или в виде производных. Грибы являются одним из наиболее перспективных источников микробного происхождения для создания новых соединений, в том числе и антибиотиков. Поэтому грибы – интересующий аналитиков объект в многочисленных программах высокопроизводительных скринингов (HTS), ориентированных на новые фармацевтические и другие биологически активных компоненты [33].

С помощью УФ-детектирования определяют время удерживания, индекс удерживания, асимметрию пика; с помощью масс-селективного детектора массу ионов.

Из приведенных в литературе данных следует, что для отдельных баз данных разработчики приводят значения метрологических характеристик, полученных в условиях воспроизводимости или повторяемости. Так стандартное отклонение повторяемости составляет (0,7 – 7,2) %, воспроизводимости – (1,0 – 11,2) %. Для большинства БД значения метрологических характеристик приводимых данных неизвестны.

Впервые идентификационные параметры веществ с установленными метрологическими характеристиками внесены в БД ВЭЖХ УФ в 2003 г., опубликованы в 2006г.[27]. Метрологические характеристики получены по результатам межлабораторного эксперимента с использованием стандартных образцов состава и аттестованных смесей.

Метод идентификации с применением тестовой смеси и БД принципиально впервые был предложен Барамом Г.И. в 2003 г. В данной работе впервые обоснован по результатам экспериментальных исследований выбор веществ-маркеров для контроля метрологических характеристик хроматографа, его хроматографических и спектральных параметров,

разработаны процедуры, реализующие метрологическое обеспечение высокоэффективных жидкостных хроматографов, используемых для идентификации и количественного определения органических соединений, впервые оценена достоверность идентификации, проводимой в соответствии с приведенным методом.

Условием применимости большинства БД является обязательность точного воспроизведения приведенных в базе данных условий получения хроматографических и спектральных характеристик веществ. К ним относятся тип хроматографа и входящих в его состав насосов, дозатора, детектора, колонки, состав подвижной фазы, применяемый адсорбент, концентрация образца и т.д. При попытке использования БД на хроматографе, отличном от исходного (на основе которого была создана БД), возникает задача определения идентичности приборов и выяснения меры их различия.

Информация об оценке достоверности идентификации в отношении опубликованных баз данных отсутствует. Исследования, проведенные по определению достоверности идентификации различными методами [15, 42-46], показали, что процесс идентификации должен сопровождаться оценкой её достоверности.

В работе [44] указано, что однозначной идентификации соответствует ситуация, в которой одному аналитическому сигналу соответствует одно вещество, и идентификация становится непростой, когда для нескольких веществ сигналы одинаковы. Подробно рассмотрен вероятностный подход определения достоверности идентификации, основанный на применении условных вероятностей и теоремы Байеса, определены вероятности ошибок первого и второго рода.

Авторы [45] рассмотрели подход к идентификации, основанный на применении так называемого значения длины списка. При таком подходе в систематическом токсикологическом анализе определяют характеристики удерживания (относительное время удерживания) желательного с

использованием больше чем одной аналитической системы. Затем применяют «метод окна», в котором «окно» определяется для неизвестного компонента. Если вещество из БД попадает в «окно», то оно становится возможным кандидатом на роль неизвестного вещества. Далее составляют список всех возможных кандидатов. Однако возможны ситуации, когда одни из кандидатов лежат ближе к центру «окна», другие – у самого края, а третьи в одной аналитической системе попадают за пределы «окна», а в другой – внутрь. Для принятия решения об однозначности идентификации во всех приведенных ситуациях вычисляют достоверность идентификации каждого кандидата. Далее выводится список всех кандидатов по убыванию достоверности и, применяя различные критерии отбора, выявляют наиболее предпочтительного кандидата. В принципе, описанная процедура является характерной для большинства способов идентификации.

В работах [15, 42] рассмотрен подход, базирующийся на вычислении ошибок 1-го и 2-го рода при идентификации и эмпирическом выборе статистического критерия. Анализ причин возможных ошибок идентификации содержится также в работе [42]. Отмечено, что ошибки идентификации при идентификации по одному параметру, а именно по времени удерживания, могут возникать по нескольким причинам. Наиболее характерными причинами являются:

1. случайный сдвиг пиков, который может происходить из-за колебаний скорости газа-носителя или скорости мобильной фазы при ВЭЖХ, а также из-за низкой повторяемости объема вводимой пробы и другим причинам;
2. недостаточная межлабораторная воспроизводимость времени удерживания, поскольку значения времени удерживания в общем случае не являются постоянными величинами, а изменяются при переходе от анализа на одной колонке к анализу на другой;
3. случайные совпадения характеристик удерживания различных веществ и др.

При рассмотрении проблемы идентификации применительно к хроматографическому анализу авторы [42] ограничиваются рассмотрением идентификации только по одной измеряемой характеристике – по времени удерживания. Приводится информация о том, что привлечение дополнительных сведений о свойствах анализируемых проб повышает надежность и достоверность идентификации, но не предлагается конкретного способа, показывающего как это утверждение можно реализовать при хроматографическом анализе.

В работе [46] рассмотрен вероятностный подход определения достоверности идентификации, основанный на применении условных вероятностей и теоремы Байеса.

Возвращаясь к метрологическому обеспечению скрининговых методик анализа в целом, следует отметить, что для успешного анализа широкого круга сложных органических веществ (в том числе, с труднодоступными стандартными образцами) с применением БД необходима разработка специальных методик измерений, позволяющих контролировать стабильность параметров хроматографа другими методами – без проведения градуировки хроматографа по анализируемому веществу. Существующие на сегодняшний день методики измерений не решают в полной мере этой задачи, т.к. в них предусмотрен контроль только некоторых параметров хроматографа. Выбор этих параметров не был обоснован, а приводимые метрологические характеристики не являются достаточными и при выполнении анализа в точном соответствии с методикой обнаруживаются только значительные выходы параметров хроматографа за установленные пределы, в то время как даже незначительные флуктуации могут оказать существенное влияние на результаты идентификации. Обоснование пределов, в которых параметры хроматографа должны оставаться стабильными, исследования по определению и обоснованию необходимых для контроля параметров хроматографа до сих пор не проводились.

Результаты аналитического обзора показали, что для успешного анализа широкого круга сложных органических веществ (в том числе, с труднодоступными стандартными образцами) с применением БД без проведения градуировки хроматографа по анализируемому веществу необходимо выбрать параметры хроматографа и разработать процедуру и средства контроля стабильности этих параметров.

Метод идентификации с применением тестовой смеси и БД принципиально впервые был предложен Барамом Г.И. в 2003 г. В данной работе автором диссертации разработаны процедуры, реализующие метрологическое обеспечение метода идентификации и метрологическое обеспечение высокоэффективных жидкостных хроматографов, используемых для идентификации и количественного определения органических соединений, впервые обоснован по результатам экспериментальных исследований, проведенных с учетом метрологических требований и норм, выбор веществ-маркеров для контроля метрологических характеристик хроматографа, его хроматографических и спектральных параметров, впервые оценена достоверность идентификации, проводимой в соответствии с приведенным методом.

Глава 2

Определение параметров хроматографа, влияющих на показатели точности измерений, достоверность идентификации и количественное определение содержания органических веществ

Основным идентификационным признаком вещества является время или объем удерживания. Показатель повторяемости измеренных значений t_R для современных хроматографов составляет (0,02-0,05) мин [10]. При проведении экспериментов в условиях внутрилабораторной прецизионности абсолютная погрешность измерений параметров удерживания, возрастает, и становится ещё больше, если анализы проводят в условиях воспроизводимости – на разных образцах хроматографов одного типа и, еще больше – на хроматографах разных типов.

Для минимизации значений характеристик погрешности удерживания иногда применяют метод «внутреннего стандарта», но при разделении веществ, значительно различающихся по полярности, необходимость введения во «внутренний стандарт» нескольких растворов стандартных образцов делает маловероятной реализацию такого подхода. Процедура становится возможной лишь в редких случаях при доступности стандартных образцов анализируемых веществ.

Показатели точности результатов измерений времени (объема) удерживания вещества зависят от целого ряда влияющих факторов: свободного объема колонки, типа и партии адсорбента, состава и скорости потока элюента, температуры колонки, точности настройки детектора. При замене колонки, которая неизбежна после выработки её ресурса, параметры удерживания изменяются. Это связано с тем, что обращено-фазовые адсорбенты, имеющие близкие значения размера пор, площади поверхности, плотности и способа прививки алкильного радикала (например, $-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ или "C18") и т.п. часто демонстрируют настолько различную селективность к

одним и тем же веществам, что замена одной колонки на другую требует существенной корректировки состава подвижной фазы [47]. Даже адсорбенты одной марки, но из разных партий заметно отличаются между собой. Лишь тщательное тестирование колонок с одинаковым адсорбентом путем хроматографирования смеси специально подобранных веществ в некоторых случаях позволяет уменьшить значение показателя воспроизводимости объема удерживания до 0,3 % для некоторых соединений [48], но это является, редким исключением из существующей практики.

Для уменьшения значений погрешности удерживания веществ при замене колонки на однотипную ряд исследователей предлагают использовать не абсолютные, а относительные величины удерживания – индексы удерживания. В качестве градуировочных веществ выбирают различные вещества основного или кислого характера (1-нитроалканы [29], алкилфенилкетоны [49] или набор веществ основного и кислого характера [50, 30, 31, 38]). В межлабораторных экспериментах, проведенных на хроматографах "Милихром А-02" (ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск) [51] в течение 3-х месяцев, погрешность времен удерживания для пяти веществ составила менее 10 % [52].

Рассматривая факторы, влияющие на значение показателей точности времени или объема удерживания веществ, кроме хроматографической колонки следует учитывать степень близости характеристик состава подвижной фазы и влияние температуры. Соответствие состава подвижной фазы заданному контролируют по значениям удерживания специально выбранных для этой цели веществ. Для минимизации влияния температуры хроматографическую колонку помещают в термостат. При температуре колонки $((30 \div 50) \pm 0,1)^\circ\text{C}$ дополнительная погрешность от влияния температуры обычно не превышает 0,1 % при изократическом элюировании [10, 58].

При небольшом числе идентифицируемых веществ (не более 25) их определение успешно осуществляется с использованием времен

удерживания. Если веществ более 25, то необходимо использовать другие идентификационные признаки.

Таковыми признаками являются нормированные спектры этих веществ, т.е. значения относительного оптического поглощения при определенных длинах волн, которые приводят в табличном или векторном виде [20, 53]. **Спектральное отношение** представляет собой отношение значения оптического поглощения вещества на одной длине волны к значению оптического поглощения вещества на другой длине волны. Значение относительного оптического поглощения (спектрального отношения) не зависит от концентрации вещества, и это обстоятельство позволяет не только идентифицировать вещество по набору его спектральных отношений, но и оценивать с их помощью гомогенность пика, то есть определять является ли полученный пик пиком одного вещества или суммарным пиком нескольких неразделенных веществ. Применяя факторный анализ, можно разделять смешанные пики на пики отдельных веществ [54, 55, 56]. В работах [17, 18, 20, 53, 57, 59 - 61] подробно рассмотрены возможности и особенности многоканального детектирования

Практически все исследователи, работающие с БД ВЭЖХ-УФ, в качестве детекторов применяют УФ спектрофотометрические детекторы на диодной матрице (ДМД), но известны два исключения. Так, в работе [62] авторы применили два последовательно соединенных фотометрических детектора с детектированием на длинах волн 254 и 280 нм, а в работе [22] – УФ спектрофотометрический детектор с возможностью быстрого автоматического циклического переключения длин волн в диапазоне 190-360 нм [51, 63].

При работе с БД ВЭЖХ-УФ процедура контроля должна быть, с одной стороны, быстрой, а с другой – охватывать весь без исключения набор параметров, влияющих на показатели точности измерений. Задача усложняется, когда работа с БД ВЭЖХ-УФ допускает использование нескольких близких по характеристикам детекторов [7], или детекторов

одного типа, но произведенных в разные годы [22]. Таким образом, задача контроля параметров детектора должна учитываться при разработке процедуры контроля основных параметров хроматографа.

Формирование и применение баз данных "ВЭЖХ-УФ" для сотен и тысяч веществ невозможно без использования компьютеров и соответствующего программного обеспечения, которые уже давно являются неотъемлемой частью хроматографа, и поэтому могут вносить свой вклад в погрешность результатов анализа.

Если в первых работах, посвященных применению компьютеров для работы с БД "ВЭЖХ-УФ" эта задача решалась весьма упрощенно [35, 64], то в настоящее время оценка влияния программного обеспечения является важным условием аттестации методики измерений методом ВЭЖХ. Так, например, по правилам Управления по качеству пищевых продуктов и лекарств США (FDA US) программное обеспечение должно соответствовать требованиям GLP (Good Laboratory Practice) и GMP (Good Manufacturing Practice). Детально обсуждаются все важнейшие аспекты проверки соответствия ПО в фундаментальной монографии [65]. В свою очередь у нас в стране руководствуются недавно принятыми нормативными документами, регламентирующими требования к программному обеспечению средств измерений – МИ 2955-2010, Р 50.2.077-2011.

Как видно из приведенных данных, характеристикой, стабильность которой исследуют во многих работах, является время удерживания вещества [17, 18, 29].

Стабильность таких параметров, как постоянство состава подвижной фазы, мертвый объем колонки, бесперебойная работа насоса, инжектора, детектора, несмотря на их влияние на результаты количественного определения, исследовали редко.

Ниже рассмотрены основные узлы хроматографа и проанализированы факторы, влияющие на показатели точности результатов измерений.

ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

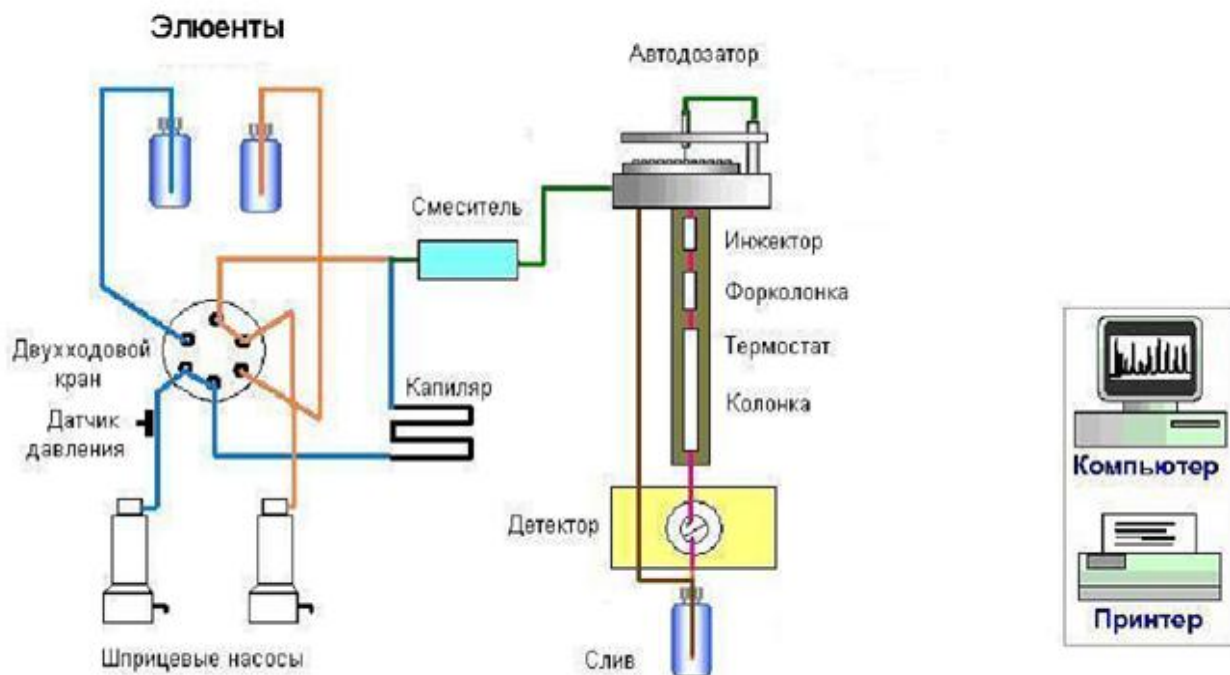


Рисунок 2.1. Схема жидкостного хроматографа

Основными узлами хроматографа являются насосы, смеситель, инжектор, колонка и детектор.

Насосы предназначены для продвижения подвижной фазы с анализируемым веществом от момента ввода пробы до её выхода после детектирования. Насосы должны быть изготовлены из материалов, химически инертных к подвижной фазе; обладать высоким рабочим давлением 15-20 МПа.

Основной характеристикой насоса, влияющей на результаты качественного и количественного анализа [4], является отсутствие пульсаций и стабильность скорости потока

Смеситель, который может быть пассивным в виде извилистого капилляра или мандрена, помещенного в капилляр, или активным, предназначен для тщательного перемешивания различных элюентов,

подаваемых на колонку. От его бесперебойной работы зависит процесс разделения компонентов в колонке.

Инжектор используется для ввода проб в хроматограф. Работой инжектора определяется воспроизводимость объема вводимой пробы и её минимальное размывание

Хроматографическая колонка предназначена для разделения анализируемой пробы на вещества, входящие в её состав. Эффективность разделения веществ зависит от качества наполнения колонки сорбентом и его свойств. Молекулы вещества передвигаются по колонке вместе с подвижной фазой, и остаются на месте при нахождении в неподвижной фазе. Чем больше сродство вещества к неподвижной фазе и чем меньше к подвижной, тем медленнее оно движется по колонке и тем дольше в ней удерживается. Вследствие того, что различные вещества имеют разную степень взаимодействия с подвижной и неподвижной фазой, достигается основная цель хроматографии – разделение смеси веществ на отдельные концентрационные зоны, хроматографические пики компонентов, по мере их продвижения по колонке [66].

Детектор, чувствительный к изменению концентрации определяемых веществ, служит для преобразования физических или физико-химических параметров этого вещества, в электрический сигнал, передаваемый на компьютер в виде хроматограммы. Достоверность идентификации и количественного определения вещества зависит от чувствительности детектора и точности настройки длины волны монохроматора.

Проведенный анализ процесса хроматографирования вещества от отбора и ввода пробы в хроматограф до детектирования, показал, что наибольшее влияние на достоверность идентификации и показатели точности измерений оказывают:

- качество упаковки колонки, использование адсорбентов из разных партий, влияющие на изменение свободного объема колонки,

увеличивающееся со временем в результате протекания различных процессов «старения» колонки, в том числе проседания частиц адсорбента;

- качество упаковки колонки, влияющее на форму пика – асимметрию пика;

- работа инжектора, который влияет на точность дозирования образца;

- настройка длин волн монохроматора УФ детектора;

- нелинейность детектора;

- работа насосов, сбои в которой могут вызывать установление градиента, форма которого отличается от заданной, что приводит к сдвигу времени и объема удерживания вещества;

- изменение состава подвижной фазы, и связанное с ним неправильное определение веществ, чувствительных к изменению кислотности элюента (pH);

- работа смесителя, сбои в которой становятся причиной искажения пиков с невозможностью их последующей идентификации и обработки.

Удобный и оригинальный способ контроля характеристик хроматографа возможен по хроматограмме некоего вещества или набора веществ [27]. Хроматограмма анализируемого вещества представляет собой кривую (рис. 2.2), отображающую зависимость концентрации вещества, выходящего из колонки с потоком подвижной фазы, от времени с момента начала разделения (от объема вышедшей подвижной фазы). На рисунке 2.2 показано определение времени удерживания компонентов смеси, асимметрии пика, ширины пика.

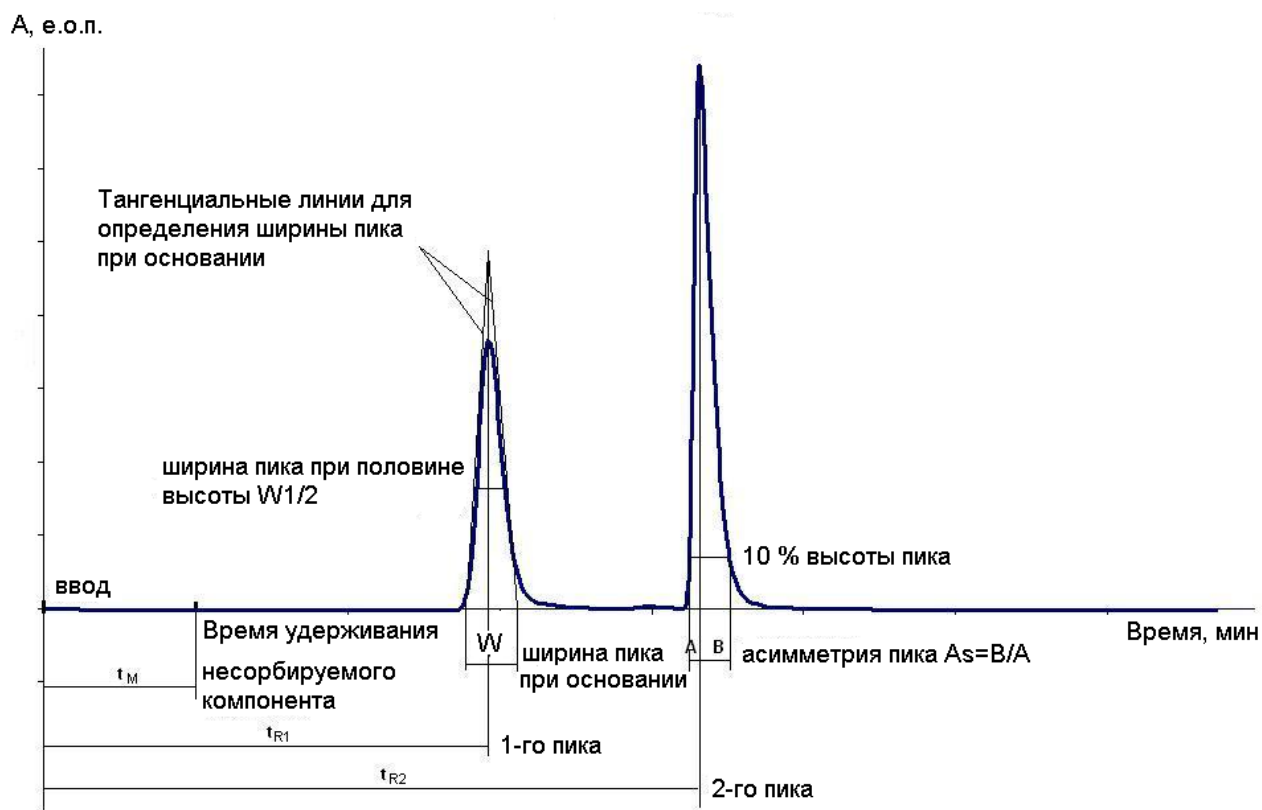


Рисунок 2.2. Пример хроматограммы анализируемого вещества

Спектр поглощения вещества (рис. 2.3) представляет собой функцию показателя поглощения вещества от длины волны излучения.

Анализ хроматограммы вещества совместно с его спектром дает разностороннюю информацию о функционировании всех узлов хроматографа.

По времени и объему удерживания, зависящему от степени взаимодействия хроматографируемого вещества с сорбентом, можно судить о свободном объеме колонки, точности формирования градиента задаваемого профиля, функционировании насосов, работе инжектора, скорости потока элюента.

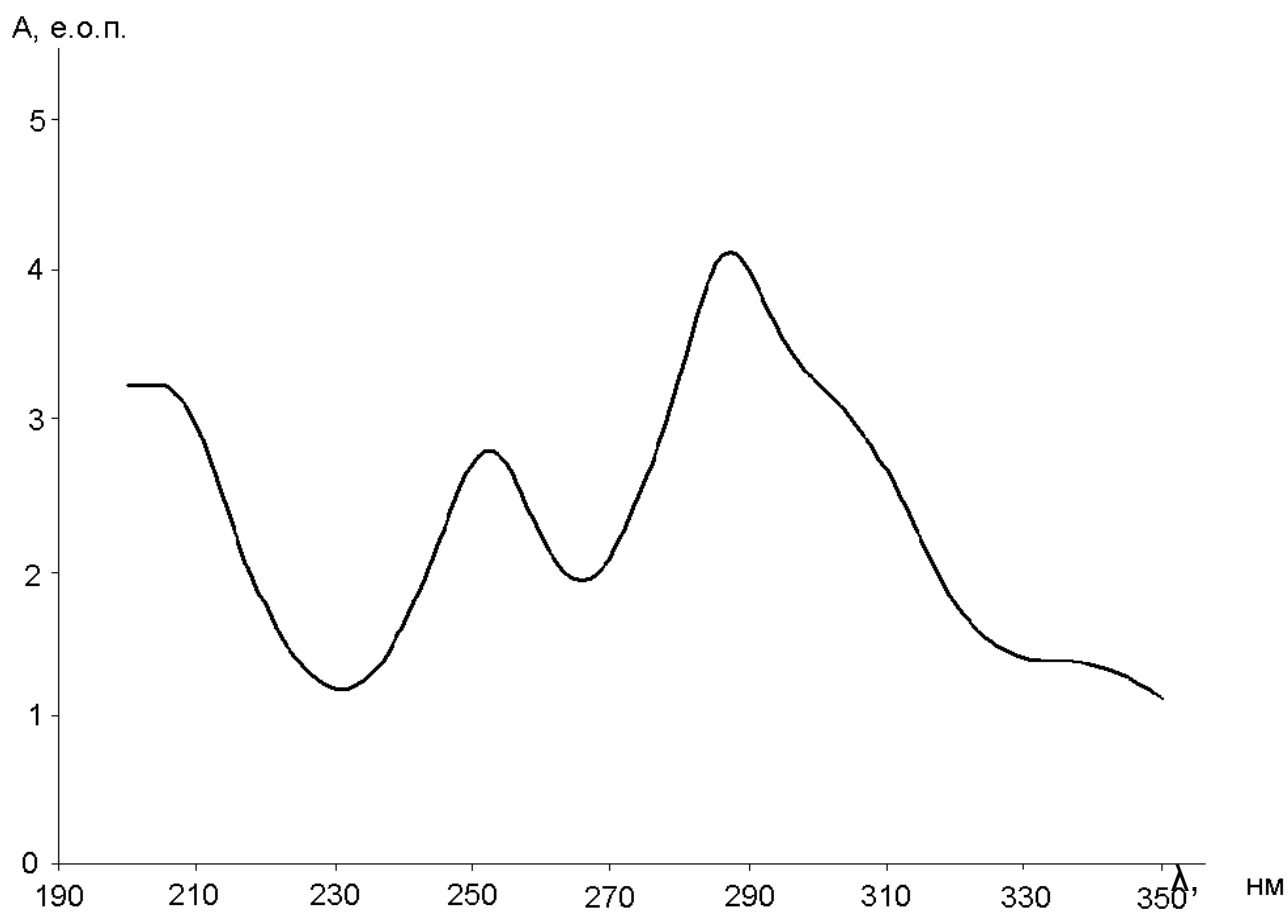


Рисунок 2.3. Спектр поглощения вещества

Асимметрия пика свидетельствует о качестве набивки колонки, о качестве работы насосов и смесителя.

В свою очередь, спектральные характеристики вещества дают информацию о точности настройки длин волн детектора, изменении значения рН элюента.

Таким образом, работу основных частей хроматографа можно оценивать при хроматографировании вещества или смеси веществ-маркеров, обладающих свойствами, которые существенно реагируют на изменение параметров хроматографа.

Глава 3

Результаты экспериментальных исследований веществ – маркеров контролируемых параметров хроматографа, и создания на их основе тестовой смеси

3.1. Выбор вещества-маркера свободного объема хроматографической колонки

Для реализации метода идентификации и количественного определения соединений с помощью БД ВЭЖХ УФ используют такую характеристику вещества как абсолютное значение объема удерживания. По объему удерживания осуществляют предварительную идентификацию анализируемых компонентов.

Использование абсолютного значения объема удерживания вещества предполагает постоянство (с известными допусками) размеров применяемых хроматографических колонок, важнейшей характеристикой которых является свободный (мертвый) объем колонки (V_0). По определению [67, 68], V_0 – часть объема колонки, не занятая сорбентом. В процессе хроматографирования V_0 соответствует объему подвижной фазы в колонке. Знание значения V_0 необходимо не только для сопоставления хроматограмм, полученных на формально "одинаковых" колонках, но и для расчета таких хроматографических характеристик веществ как факторы удерживания, а также для масштабирования хроматографических процессов.

Для выбора вещества-маркера свободного объема колонки исследовали водные растворы солей KBr , KJ , KNO_3 , $KSCN$ с использованием для определения свободного объема колонки пикнометрического, весового и хроматографического метода [69].

а) Пикнометрический метод предполагает поочередное взвешивание колонки, заполненной растворителями с различными плотностями. Значения V_0 рассчитывали по формуле:

$$V_0 = \frac{W_x - W_y}{\rho_x - \rho_y}, \quad (3.1)$$

где W – масса колонки, заполненной растворителем x или y ;

ρ – плотность растворителя.

б) Весовой метод заключается в измерении массы подвижной фазы, находящейся в колонке, которую находят по разности масс колонки, заполненной растворителем и высушенной до постоянной массы.

в) Хроматографический метод состоит в измерении объема удерживания «неудерживаемых» (несорбирующихся) веществ. В качестве таких веществ-маркеров в обращенно-фазовой хроматографии с УФ-детектированием применяют гидрофильные вещества как нейтральные (тиомочевину, урацил, ацетон, формамид и др.), так и ионогенные (неорганические и органические соли).

Пикнометрический метод трудоемок и неудобен для частого применения; обычно его используют для сравнения с результатами, полученными другими методами.

Для определения V_0 весовым методом колонку, заполненную ацетонитрилом, взвешивали, затем высушивали в сушильном шкафу при температуре 80°C до постоянной массы в течение 12-14 часов. Очевидно, что для адсорбентов, которые не допускают высушивания, этот метод неприменим.

При использовании хроматографического метода измерений V_0 учитывали основную особенность, заключающуюся в вводе пробы в колонку после остановки потока и сброса давления для хроматографов типа Милихром, и связанную с этим необходимость учета сжимаемости подвижной фазы. Эффект сжимаемости влияет на формирование постоянной объемной скорости элюента и приводит к тому, что вычисляемые по хроматограмме объемы удерживания веществ как $V_R = F \cdot T_R$, оказываются

завышенными на объем сжатия подвижной фазы от атмосферного давления до рабочего, соответствующего заданной скорости потока [51, 70, 71].

Измерение объема сжимаемости подвижной фазы, находящейся во всей хроматографической системе, за исключением колонки, (определение поправки на сжатие для определения действительного значения V_0) проводили, заменяя колонку коротким фторопластовым капилляром. Капилляр герметично пережимали. Включали насос, заполненный ацетонитрилом или водой, и при достижении заданного давления в диапазоне от 1 до 7 МПа останавливали поток. Капилляр опускали в предварительно взвешенную пробирку, разжимали зажим и собирали выдавленную жидкость. Объем собранной жидкости, соответствующий объему сжатия, находили по разности масс пустой пробирки и пробирки с жидкостью с учетом плотности жидкости.

Действительный объем удерживания вещества ($V_{действ}$) рассчитывали по формуле:

$$V_{действ} = V_{хром} - \Delta V, \quad (3.2)$$

где $V_{хром}$ – объем удерживания неударживаемого вещества, полученный из хроматограммы, мм³,

ΔV - поправка на сжимаемость жидкости, мм³, определяемая как

$$\Delta V = V_1 \cdot \beta_t \cdot \Delta p, \quad (3.3)$$

где β_t – средний коэффициент сжимаемости жидкости, [МПа]⁻¹, который, в свою очередь, определяется как

$$\beta_t = \frac{V_1 - V_2}{p_2 - p_1} \cdot \frac{1}{V_1}, \quad (3.4)$$

где V_1 – объем жидкости при давлении p_1 и температуре t , V_2 – объем жидкости при давлении p_2 при той же температуре.

Для определения значения V_0 в колонку 2x75 мм, заполненную *ProntoSIL-120-5-C18 AQ*, вводили водные растворы солей *KBr*, *KI*, *KNO₃* и *KSCN* (квалификация х.ч.) с концентрацией 1,0 мг/см³, регистрируя пики гидрофильных УФ-поглощающих анионов.

Полученные результаты, приведены в таблице 3.1.

Таблица 3.1.

Значения V_0 колонки 2x75 мм с *ProntoSIL-120-5-C18 AQ*, найденные хроматографическим, весовым и пикнометрическим методами

Хроматографический метод				Весовой метод			Пикнометрический метод			
Анион	V_0 , МКЛ		σ_r ,	σ_R ,	$V_{0\text{ сред.}}$,	σ_r ,	σ_R ,	$V_{0\text{ среднее}}$,	σ_r ,	σ_R ,
	$V_{\text{хром.}}$	$V_{\text{действ.}}$	%	%	МКЛ	%	%	МКЛ	%	%
Бромид (<i>KBr</i>)	144,4	133,1	0,05	0,5	155,3	0,6	3,7	142,7	1,5	6,2
Йодид (<i>KI</i>)	151,3	140,0	0,06	0,2						
Нитрат (<i>KNO₃</i>)	146,9	135,6	0,15	0,2						
Роданид (<i>KSCN</i>)	165,7	154,4	0,30	0,4						

Наилучшее совпадение значений V_0 , найденных хроматографическим методом, со значениями V_0 , измеренными весовым и пикнометрическим методами, получено для йодид- и роданид-анионов. Учитывая, что значение оптического поглощения йодид-аниона (рис.3.1) больше, чем роданид-аниона, содержание его в пробе по сравнению с содержанием роданид-аниона может быть снижено в несколько раз. Это позволяет выбрать йодид-анион в качестве маркера свободного объема [77].

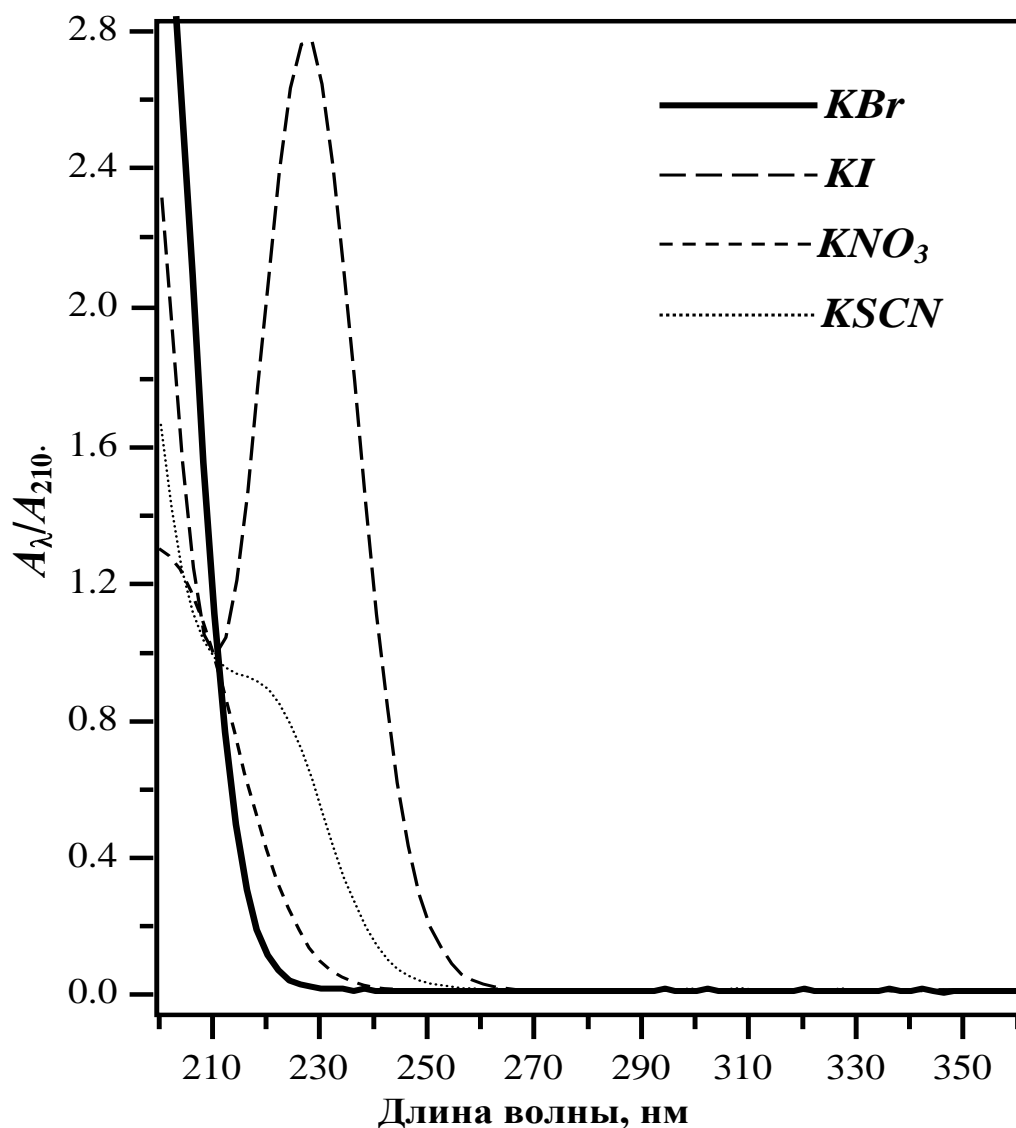


Рисунок 3.1. Нормированные УФ-спектры водных растворов KBr , KI , KNO_3 и $KSCN$

3.2. Выбор вещества-маркера качества упаковки колонки

Одним из показателей качества упаковки колонки является асимметрия пика, контроль которой необходим для точного определения объема удерживания вещества.

Асимметрия пика определяется отношением полуширины пика хвостовой части пика к полуширине пика фронтальной части (рис. 2.3). Если это отношение – коэффициент асимметрии, лежит в интервале $(0,8 \div 1,3)$ для новых колонок, то качество упаковки колонки признается хорошим [72].

Наглядным примером асимметричного пика является второй пик на рисунке 2.3, его форма отклоняется от идеальной симметричной формы пика Гаусса. Хвостовая половина пика заметно шире фронтальной. Наличие асимметричного хвоста пика может заметно влиять на качество разделения [73].

Если коэффициент асимметрии пика становится больше 2,0, это является свидетельством ухудшении разделения веществ. При большей, чем приемлемо, асимметрии, заметно изменяется высота пика, площадь пика остается неизменной. Большие сложности также возникают с разметкой конца пика, и при многократных анализах одного и того же вещества, среднее квадратическое отклонение повторяемости площади пика будет увеличиваться.

В качестве вещества – маркера асимметрии пика можно использовать в принципе любое УФ поглощающее вещество, в данной работе выбран *орто*-Нитроанилин.

3.3. Выбор вещества-маркера для контроля инжектора

Работу инжектора, который предназначен для ввода пробы в хроматографическую колонку, контролируют с помощью различных веществ. Целесообразно использовать вещество-маркер, площадь пика которого, вычисляется с минимальной погрешностью. Например, компания Agilent Technologies [74] использует для дополнительной проверки качества работы хроматографической системы, в части проверки работы инжектора, кофеин.

В соответствии с документом Европейского управления по качеству лекарственных средств и здравоохранения [75] проверку воспроизводимости объема вводимой пробы выполняют с применением метил-, этил- и пропилпарабена.

Для определения лучшего вещества-маркера проводили хроматографирование различных по значению площади пика веществ: кофеина, мета-нитроанилина, орто-нитроанилина и пирена, и определяли вещество с наибольшей точностью определения площади пика. Хроматографирование проводили в условиях воспроизводимости.

По результатам проведенных экспериментов (табл.3.2) установлено, что лучшими кандидатами в маркеры контроля инжектора являются кофеин и *орто*-Нитроанилин, как вещества, дающие на хроматограмме большие значения площади пика.

Таблица 3.2.

Вещества, исследованные для выбора маркера контроля инжектора

Наименование вещества	Площадь пика, е.о.п.·мкл	Показатель точности (СКО воспроизводимости) при P=0,95
Кофеин	401,8	± 2,1
Мета-нитроанилин	21,2	± 2,5
Орто-нитроанилин	25,1	± 2,0
Пирен	18,9	± 2,2

В качестве вещества-маркера удобно использовать уже выбранный для контроля асимметрии пика, *орто*-Нитроанилин.

3.4 Выбор вещества-маркера точности установки длин волн УФ детектора

Для контроля точности установки длин волн монохроматора УФ детектора применяют целый ряд растворов веществ, спектры которых наиболее чувствительны к изменению настройки монохроматора. Для данного типа колонки с обращенной фазой наиболее подходящими являются

дезоксирибоаденозин, дезоксирибогуанозин, дезоксирибоцитозин, тимидин, уридин, урацил, бензол, бифенил, антрацен, пирен, *орто*-нитроанилин, а также полистирол в виде плёнки с толщиной в несколько микрометров. Спектры дезоксирибоаденозина, дезоксирибогуанозина, дезоксирибоцитозина, тимидина, уридина, урацила, бензола, бифенила, антрацена, пирена приведены на рисунке 3.2.

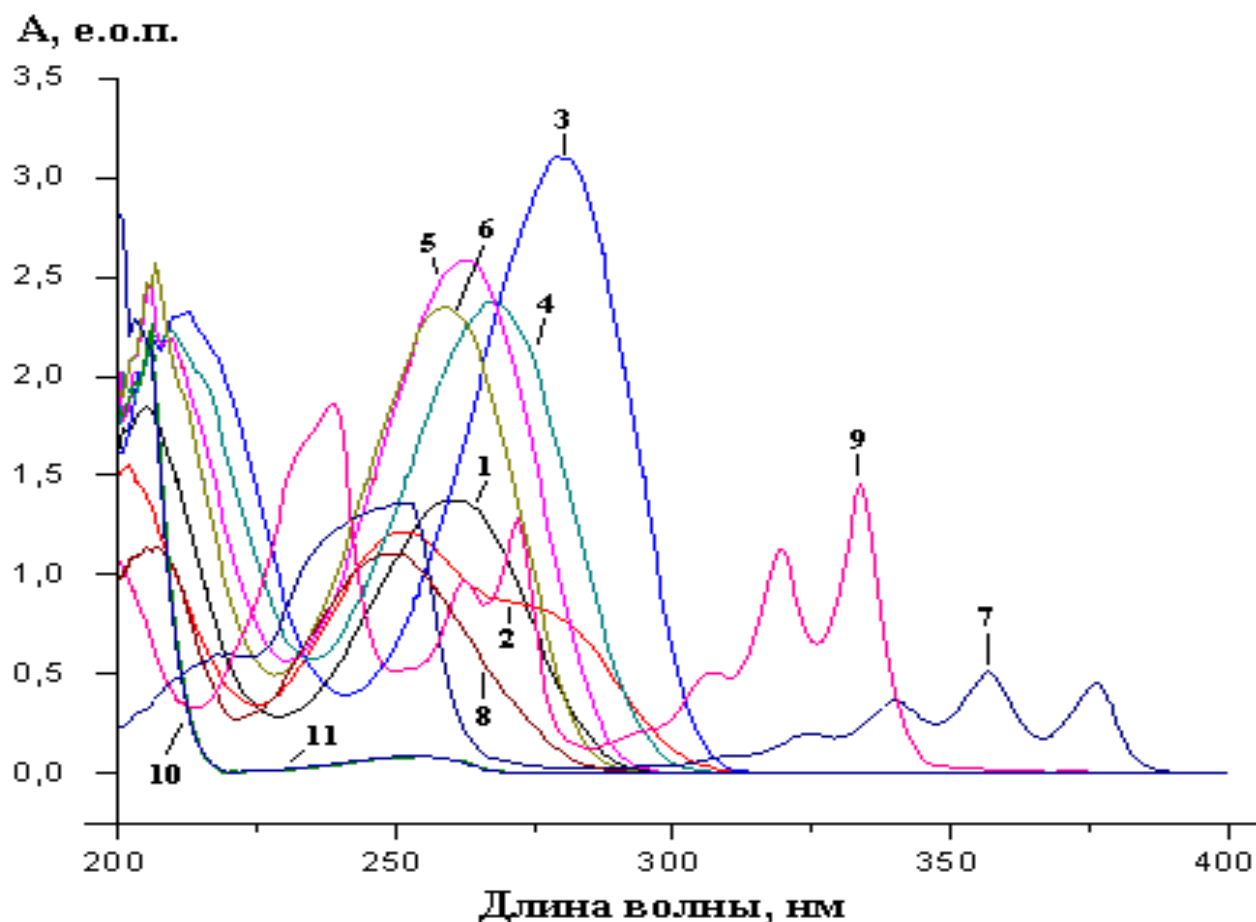


Рисунок 3.2. Спектры веществ, записанные на спектрофотометре Shimadzu 2500: 1 – дезоксирибоаденозин, 2 – дезоксирибогуанозин, 3 – дезоксирибоцитозин, 4 – тимидин, 5 – уридин, 6 – урацил, 7 – антрацен, 8 – бифенил, 9 – пирен, 10 – бензол, растворенный в ацетонитриле, 11 – бензол, растворенный в воде.

Спектры (средние значения из 3-5 записанных спектров) исследованных веществ-кандидатов в маркеры, полученные в условиях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности, приведены на рисунке 3.3. [76].

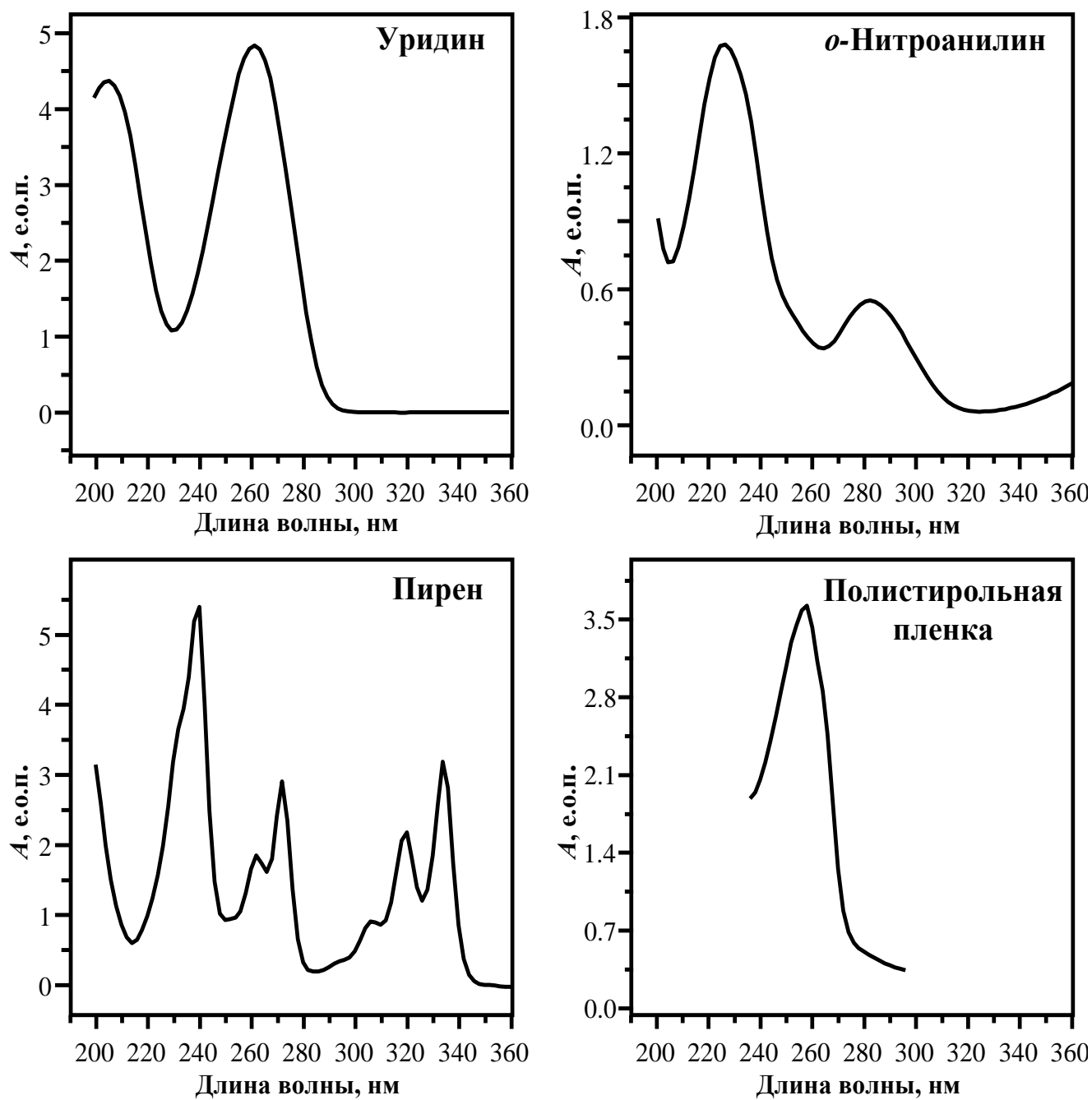
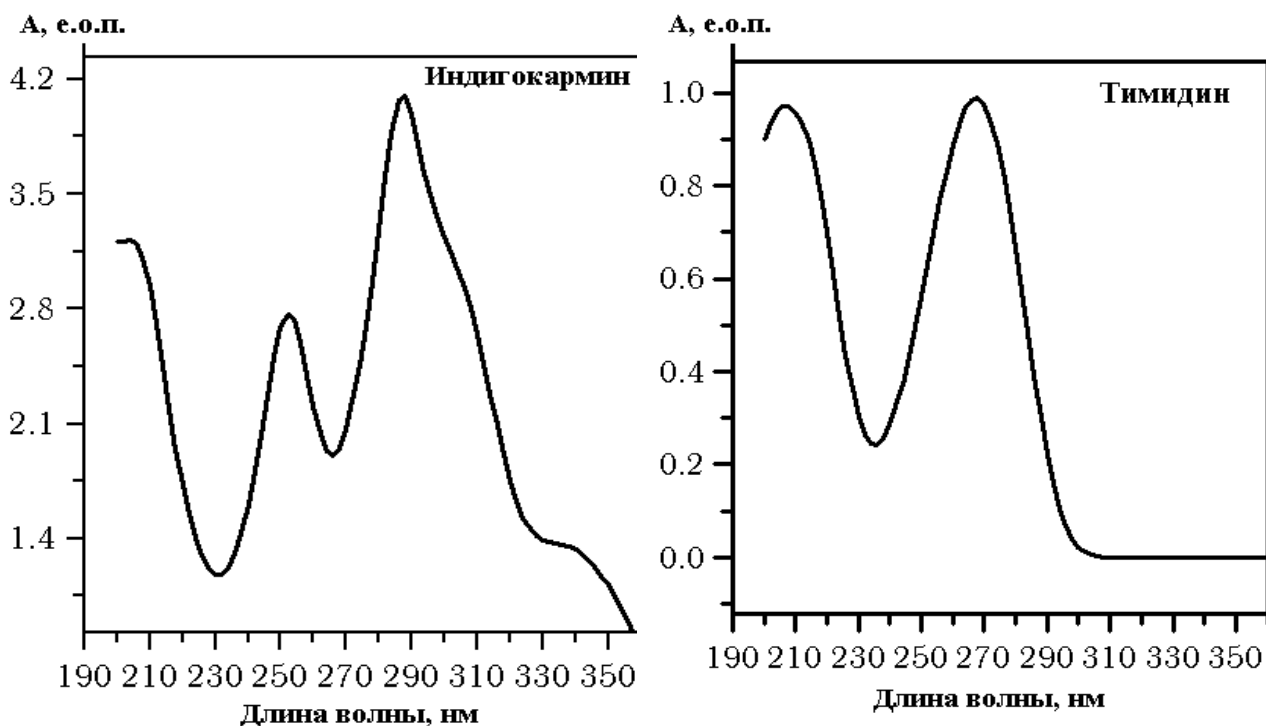


Рисунок 3.3. Спектры растворов веществ – кандидатов в маркеры точности установки длины волны детектора



Продолжение рисунка 3.3.

Точность установки длины волны монохроматора обычно оценивают по положению максимумов спектральной кривой относительно известного "реперного" значения. Поскольку спектральные полосы в УФ-спектрах весьма широкие (10-40 нм), то точность такой оценки составляет обычно не больше 1-2 нм. Кроме того, такой способ требует записи полного спектра вблизи максимума поглощения после остановки потока элюента.

Более чувствительным способом является измерение оптической плотности на крутых склонах спектра.

Под «чувствительностью» подразумевали уровень восприимчивости вещества к изменению параметров хроматографа.

Именно на крутых склонах спектра отклонение настройки монохроматора от реперной приводит к наибольшему изменению поглощения, что, в свою очередь, обеспечивает максимальную чувствительность оценки. Чтобы исключить погрешность, связанную с измерением абсолютной оптической плотности, спектр необходимо

нормировать на величину поглощения вблизи какого-нибудь спектрального максимума.

Еще большую чувствительность можно достичь при измерении поглощения не в одной точке спектра на его крутом склоне, а в двух точках, расположенных справа и слева относительно максимума.

Все три способа проиллюстрированы на рисунке 3.4.

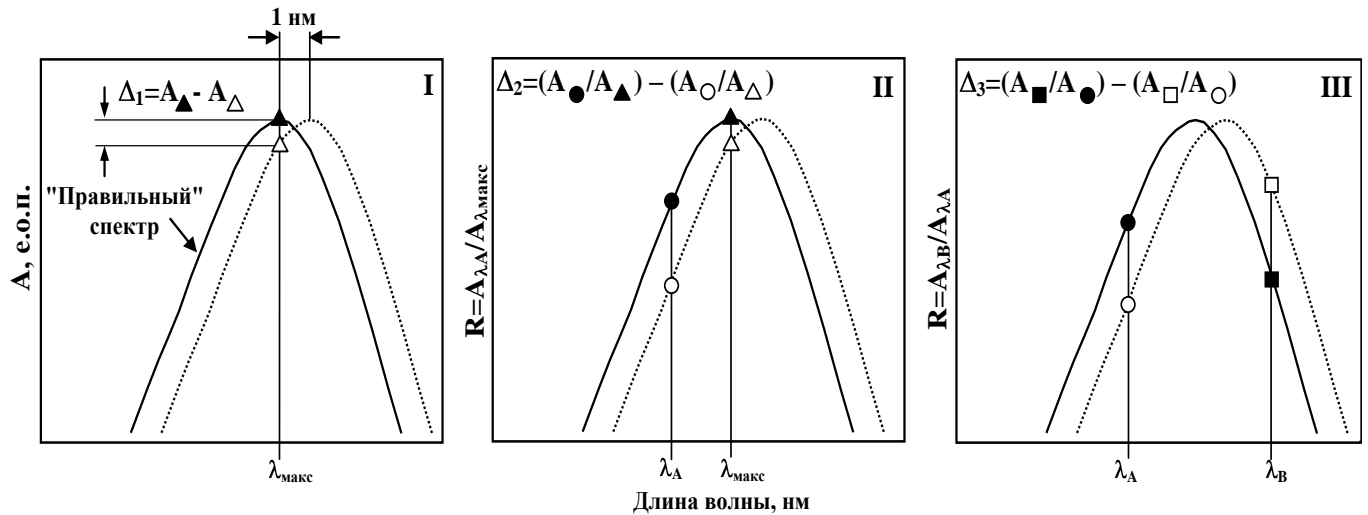


Рисунок 3.4. Три способа оценки погрешности установки длины волны

I- измерение поглощения при одной длине волны;

II- измерение поглощения при двух длинах волн $\lambda_{\text{макс}}$ и λ_A ;

III- измерение поглощения при двух длинах волн λ_A и λ_B .

Погрешность установки длины волны оценивали по разности измеренных и установленных ранее параметров:

- значений максимумов пиков, измеренных при одной длине волны (способ **I**);
- спектральных отношений при $\lambda_{\text{макс}}$ и λ_A (способ **II**);
- значений поглощений при двух длинах волн λ_A и λ_B . (способ **III**).

Для количественного определения чувствительности по способу **III** на всех записанных спектрах после их нормирования выбирались короткие участки с наибольшим наклоном, которые, в первом приближении, можно считать прямыми вида $y=ax+b$. Эти отрезки прямых параллельно сдвигались

влево и вправо так, как это произошло бы при изменении настройки монохроматора на +1 и - 1 нм ($y_{-1}=ax+b_{-1}$ и $y_{+1}=ax+b_{+1}$). Так как прямые являются параллельными, то мерой чувствительности данного участка спектра к изменению установки длины волны является разность $\Delta=|b_{+1}-b_{-1}|$. Иллюстрация такого подхода на примере спектра пирена показана на рис. 3.5.

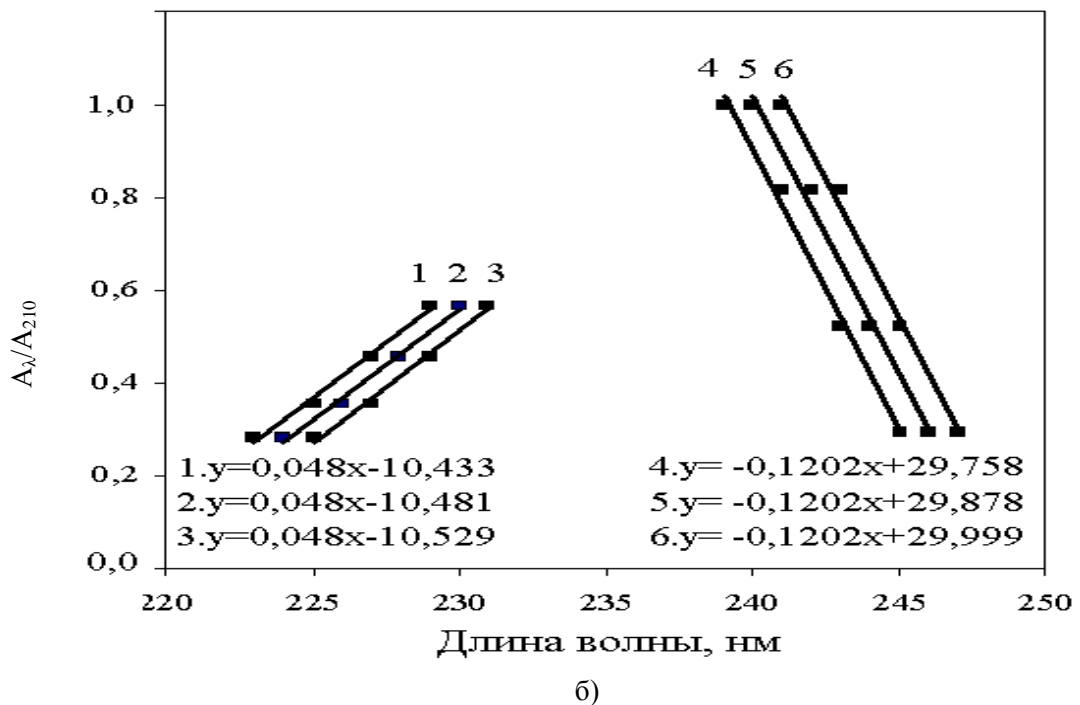
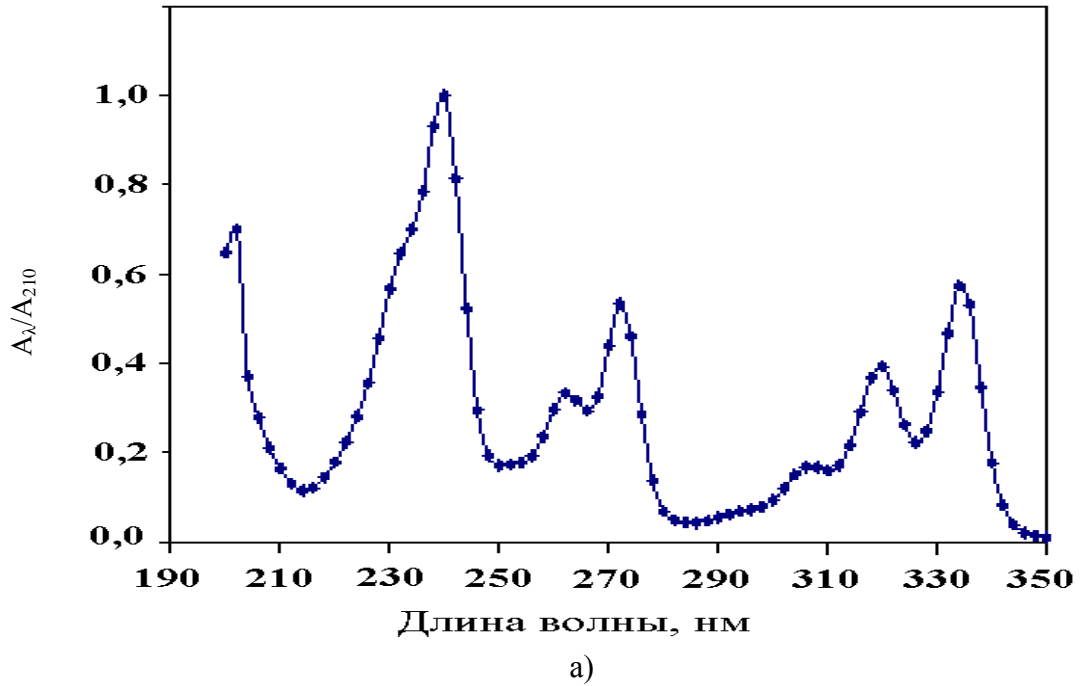


Рисунок 3.5. Определение изменений спектральных отношений ("чувствительности") веществ на примере пирена (а) – спектр пирена, (б) –

иллюстрация сдвига спектра пирена на 1 нм, возникающего в результате сдвига настройки монохроматора УФ детектора

В табл.3.3 представлены результаты экспериментальных исследований всех кандидатов в маркеры точности установки длины волны монохроматора.

Таблица 3.3.

Вещества, исследованные для выбора маркера точности установки длины волны монохроматора УФ детектора

Название вещества	Длина волны, нм								Угловой коэффициент линии тренда при λ_x	Длины волн, нм		Отношения оптической плотности поглощения на длинах волн x и y , разность отношений			Чувствительность* на разных длинах волн, нм
	210	220	230	240	250	260	280	300		λ_x	λ_y	$A_x/A_y = a$	$A_{x-1}/A_{y-1} = b, b-a$	$A_{x+1}/A_{y+1} = c, c-a$	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
о-Нитроанилин									0,040	220	210	1,769	1,714 0,595	1,833 0,064	0,05 0,50
			●	—	●				-0,013	230	210	1,854	1,698 0,156	2,036 0,182	0,20 0,17
									-0,048	240	210	1,167	0,997 0,170	1,365 0,198	0,18 0,15
									-0,010	250	210	0,592	0,532 0,060	0,662 0,070	0,50 0,43
								260		210	0,400	0,353 0,046	0,454 0,054	0,65 0,56	
									-0,012	300	210	0,346	0,300 0,046	0,399 0,053	0,65 0,56
пирен		●	—	●					-0,047	204	226	0,957	0,755 0,202	1,211 0,254	0,15 0,12
									0,045	226					
			●	—	●			228		244	0,966	1,386 0,42	0,707 0,260	0,07 0,15	
									-0,122	244					

Продолжение таблицы 3.3.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
пирен									0,025	260					
									-0,063	276	260	1,024	0,745 0,279	1,355 0,332	0,11 0,09
									-0,063	274	228	0,870	0,679 0,191	1,101 0,231	0,16 0,13
										276	226	0,751	0,533 0,218	1,025 0,274	0,14 0,11
индиго кармин		●—●							-0,030	220	210	0,581	0,563 0,018	0,598 0,017	1,50 1,76
			●—●						0,027	240	220	0,929	1,073 0,1431	0,805 0,124	0,21 0,25
				●—●					-0,023	260	248	0,873	0,800 0,073	0,954 0,080	0,43 0,38
									0,037	280					
пленка полистирола									-0,012	300	280	0,991	0,934 0,057	1,054 0,063	0,53 0,48
									0,031	250					
тимидин									-0,083	270	250	0,925	0,781 0,144	1,083 0,158	0,21 0,19
									-0,044	220					
			●—●						0,035	250	220	0,811	0,916 0,106	0,717 0,093	0,28 0,33
										250	280	0,835	0,949 0,114	0,736 0,100	0,27 0,30
									-0,046	280					

Примечания:

* - под «чувствительностью» понимают изменение спектрального отношения маркера при возможном изменении настройки длин волн монохроматора и последующем сдвиге спектра вещества-маркера, и соответственном изменении спектральных отношений. Первое число представляет собой чувствительность при сдвиге спектра влево на 1 нм, второе – чувствительность при сдвиге спектра вправо на 1 нм.

●—● - диапазон длин волн, точность установки которых обеспечивается при применении для контроля указанного вещества.

Анализ полученных результатов показал, что наиболее подходящим веществом является пирен, который обеспечивает погрешность установки

длины волны в пределах $\pm 0,2$ нм, тогда как для уридина и *o*-нитроанилина это значение составляет $\pm 0,5$ нм. Вторым важным качеством пирена является покрытие широкого диапазона спектра.

3.5 Выбор вещества - маркера линейного диапазона детектора

Линейный диапазон детектора традиционно контролируют по кофеину. Такой выбор сделан исходя из опыта контроля линейности УФ детекторов разных типов.

Зависимость отклика детектора от массовой концентрации кофеина на всех длинах волн детектора представлена на рисунке 3.6.

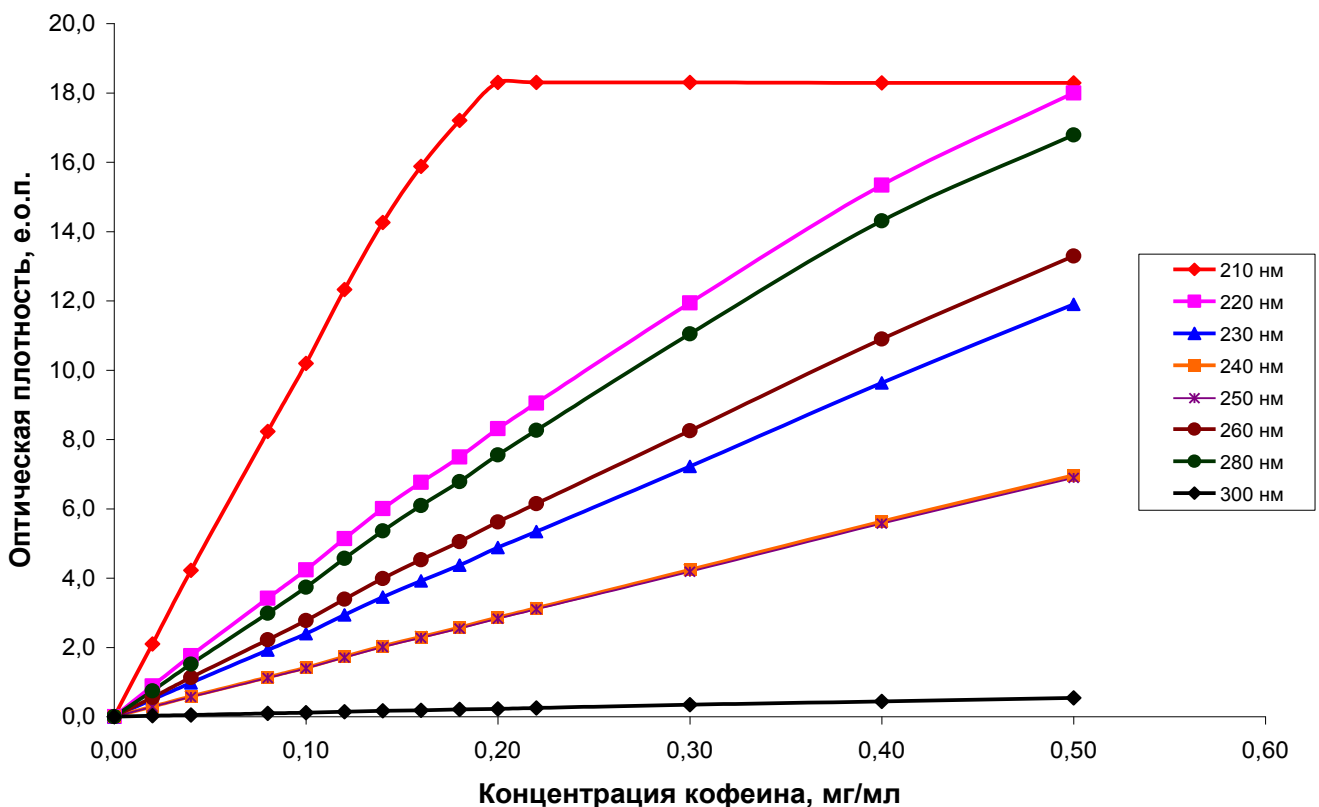


Рисунок 3.6. Зависимость отклика детектора от массовой концентрации кофеина

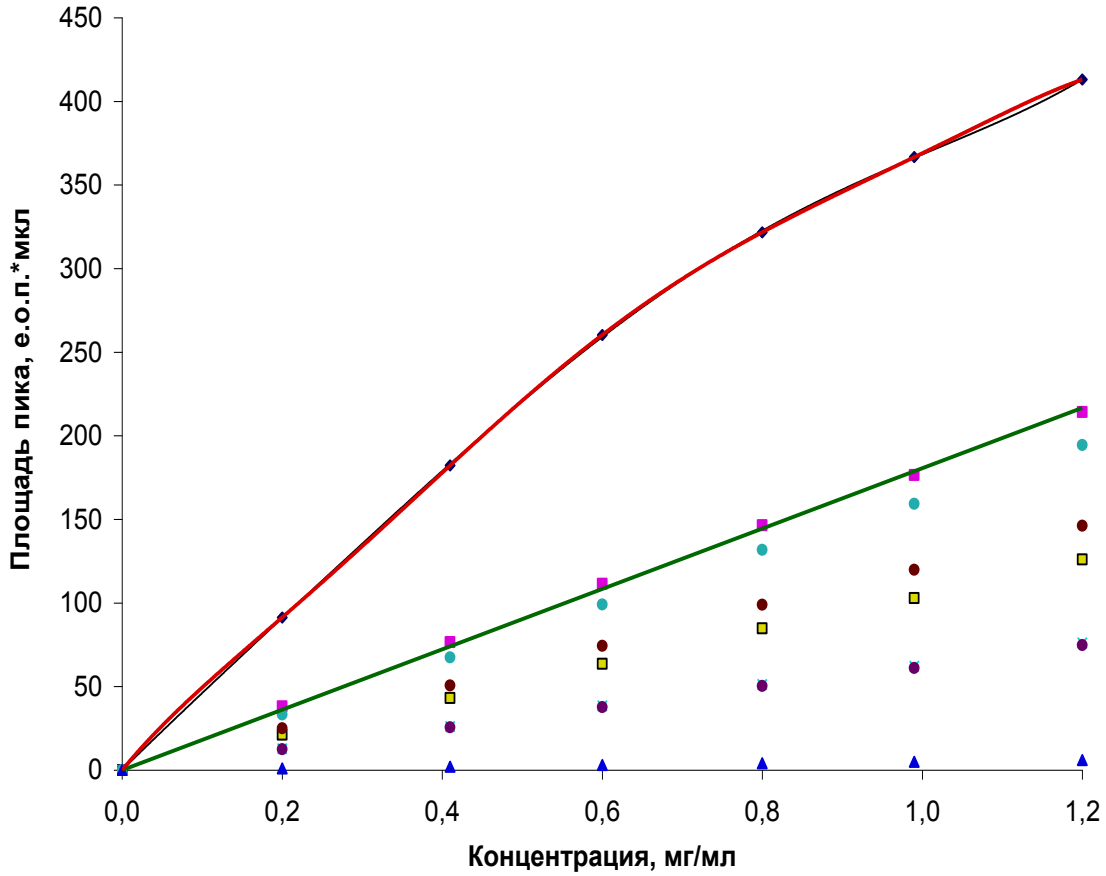


Рисунок 3.6. (продолжение)

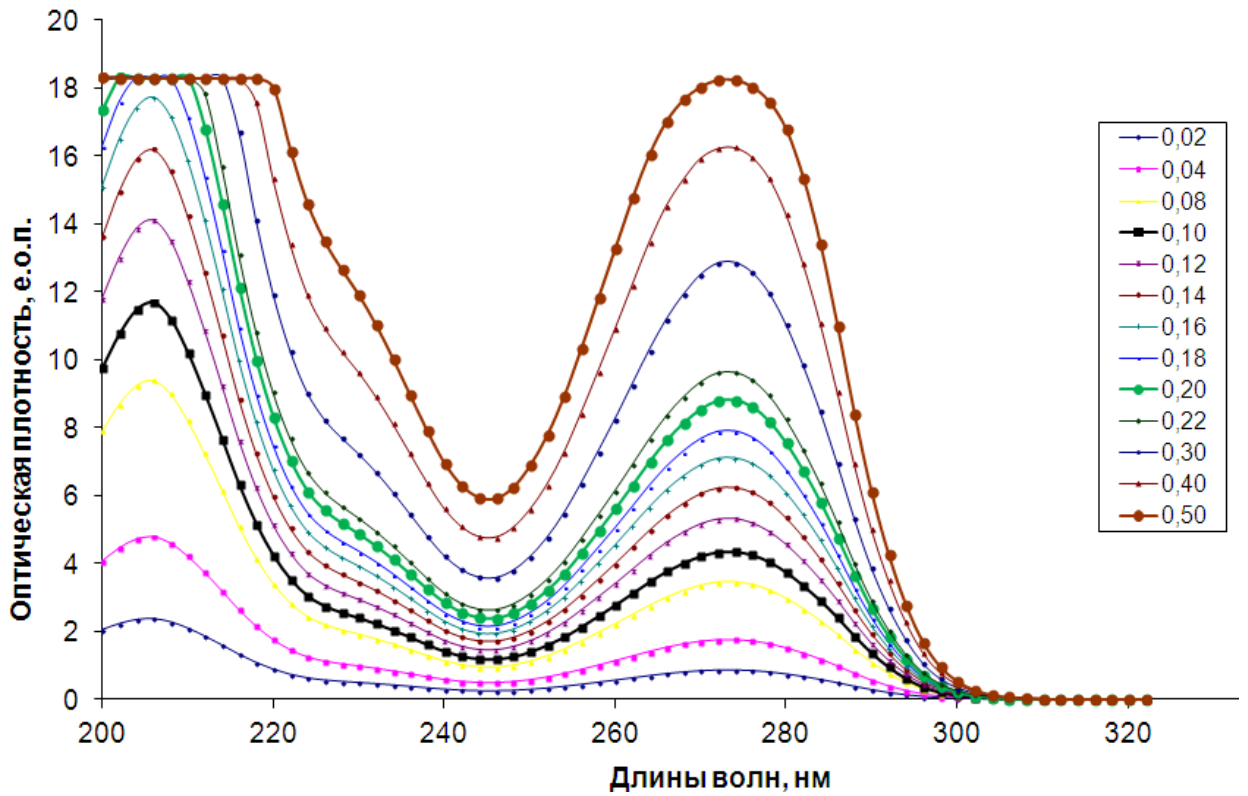


Рисунок 3.6. (окончание)

Отклик детектора перестает быть линейным при небольших концентрациях кофеина в пробе. Начиная с концентрации 0,2 мг/мл, отклик детектора на длине волны $\lambda = 210$ нм становится нелинейным, в то время как при $\lambda = 260$ нм он линеен до концентрации 0,5 мг/мл. При концентрации больше 0,5 мг/мл нелинейность проявляется и на других длинах волн. Поэтому кофеин является лучшим веществом для контроля линейного диапазона УФ детектора.

3.6 Выбор вещества-маркера контроля работы насосов

Работу насосов контролируют с применением уридина и сходных с ним по свойствам веществ (урацилом, пиреном и т.п.).

В исследуемом хроматографе применяют 2 насоса шприцевого типа с независимыми приводами на шаговых электродвигателях. Прецизионный механизм насосов обеспечивает высокую повторяемость формирования градиента, минимальную нестабильность подачи элюентов, практически полное отсутствие пульсации потока подвижной фазы, которая характерна для плунжерных насосов.

С применением такого типа насосов условия разделения различных веществ можно считать практически стационарными.

Однако при возможном сбое в работе насосов, их рассогласовании возникает эффект «передавливания» жидкости – элюент из магистрали одного насоса может попасть в магистраль другого. При этом, как правило, в разных магистралях находятся разные по полярности элюенты или просто различные растворители, которые для реализации процесса хроматографии должны смешиваться в конкретной пропорции.

Наибольшее влияние эффект передавливания оказывает при градиентном элюировании, при реализации которого в течение анализа состав подвижной фазы изменяется по заранее заданному алгоритму. Это

связано с тем, что любые незапрограммированные изменения приведут к сбоям в формировании хроматографического пика.

Так как в хроматографах серии "Милихром" ввод пробы в колонку осуществляется при атмосферном давлении, установленное значение скорости подачи подвижной фазы достигается не сразу. В начале хроматографической процедуры, когда давление на входе в колонку повышается от атмосферного до "рабочего", из-за сжимаемости подвижной фазы скорость потока нестационарна. Это приводит к передавливанию растворов из магистрали "А" в магистраль "Б" или наоборот, в зависимости от начальной концентрации подвижной фазы, что, в свою очередь, приводит к искажению формы градиента. Если объем "передавленного" раствора велик, а смеситель не в состоянии сгладить образовавшуюся концентрационную волну, то следствием этого эффекта будет являться расщепление пика малоудерживаемого вещества-маркера.

Иллюстрация этого эффекта приведена на рисунке 3.7. – вещество-маркер, например уридин или пирен, выходит на хроматограмме в виде двойного пика.

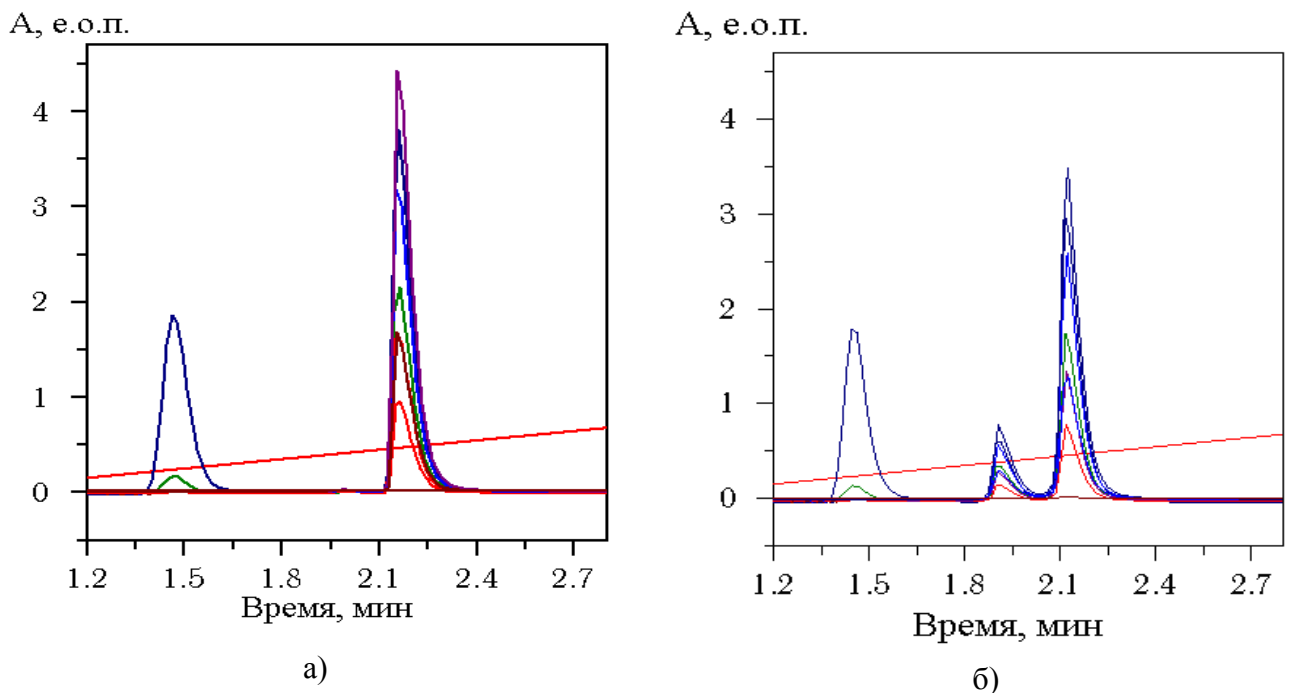


Рисунок 3.7. Форма выходного сигнала вещества-маркера при работе

насосов в соответствии с заданным алгоритмом формирования подвижной фазы (а) и при сбое в работе насосов (б)

Учитывая, что пирен выбран для контроля точности настройки монохроматора, целесообразно для контроля функционирования насосов тоже применять пирен.

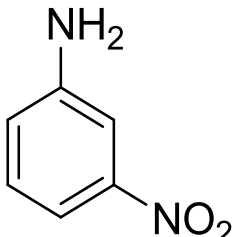
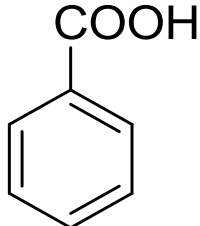
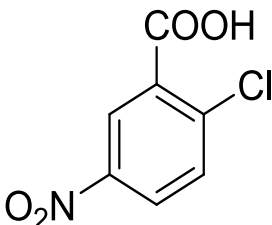
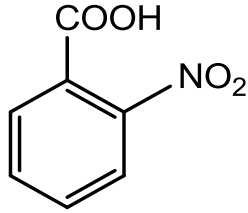
3.7 Контроль значения рН элюента и обоснование выбора вещества-маркера

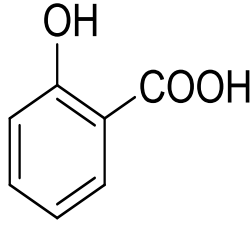
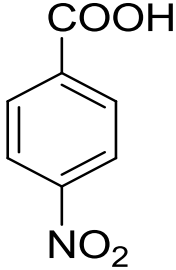
Выбор и поддержание постоянным значения рН элюента имеет важное значение, потому что при изменении рН времена удерживания и спектральные характеристики ионизованных и неионизованных форм анализируемых кислот и оснований существенно меняются [78]. Изменение значения рН даже на доли рН, приводит к заметному изменению объема удерживания. Также известно, что при изменении значения рН раствора вблизи значения pK_a анализируемого вещества может существенно изменяться электронный спектр вещества. Такие вещества выбирают маркерами, чувствительными к изменению значения рН [79].

Для выбора вещества-маркера контроля рН элюента исследовали вещества, константы ионизации которых (K_a) находятся в интервале ($10^{-2} \div 10^{-4}$) моль/л, так как согласно разработанным ранее методикам измерений для хроматографов типа «Милихром А-02» начальное значение рН подвижной фазы составляет 2,3 ($[H^+] \approx 5 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Выбранные вещества – маркеры должны хорошо растворяться в водно-ацетонитрильной подвижной фазе.

Были исследованы спектральные характеристики *мета*-нитроанилина, бензойной кислоты, 2-хлор-5-нитробензойной кислоты, *пара*-нитробензойной кислоты, *орто*-нитробензойной кислоты, салициловой кислоты, характеристики которых приведены в таблице 3.4.

Свойства веществ-кандидатов в маркеры хроматографического
контроля значения рН элюента

Вещество		pK_a	М	Растворимость, г/л [84]
1	2	3	4	5
мета- Нитроани- лин		$pK_{a1}=2.50$ (25°C) [83] $pK_{a2}=9.4$ (0°C) [82]	138,12	0,9 в воде (25°C) 78 в этаноле (25°C) 27 в бензоле (25°C)
Бензойная кислота		4,2 [85] 4,19 [19], [81] 4,18 (25°C) [83]	122,12	2,9 в воде (20°C) 584 в спирте (25°C) 408 в эфире (25°C) 122 в бензоле (25°C)
2-Хлор-5- нитробен- зойная кислота		2,17 [86]	201,56	3,6 в воде (15°C)
орто- Нитробен- зойная кислота		2,21 [80] 2,47 [86]	167,12	6,25 в воде (15°C) 469,6 в этаноле (25°C) 4,5 в хлороформе (30°C)

1	2	3	4	5
Салицило- вая кислота		2,97 [86]; 2,98 (20°C) [81]	138,12	1,8 в воде (20°C) 8,2 в воде (60°C)
<i>n</i> -Нитробен- зойная кислота		3,44 [18, 80, 81]	167,13	0,2 в воде (15°C) 23 в этаноле (25°C) 1 в хлороформе (20°C)

Кислотность водно-ацетонитрильных растворов регулировали добавкой ортофосфорной кислоты. Значение рН этих растворов составляла 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 и 3,5.

Для выбора вещества – маркера, спектр которого наиболее чувствителен к изменению рН элюента, записывали спектры веществ в растворах с различными значениями рН, сравнивали оптическую плотность в экстремальных точках спектров растворов при значениях рН в диапазоне от 1,5 до 3,5. Для количественного определения «чувствительности» спектра вещества к изменению рН вычисляли спектральные отношения при длинах волн, соответствующих максимумам и изобестическим точкам (длина волны, при которой оптическое поглощение не зависит от рН):

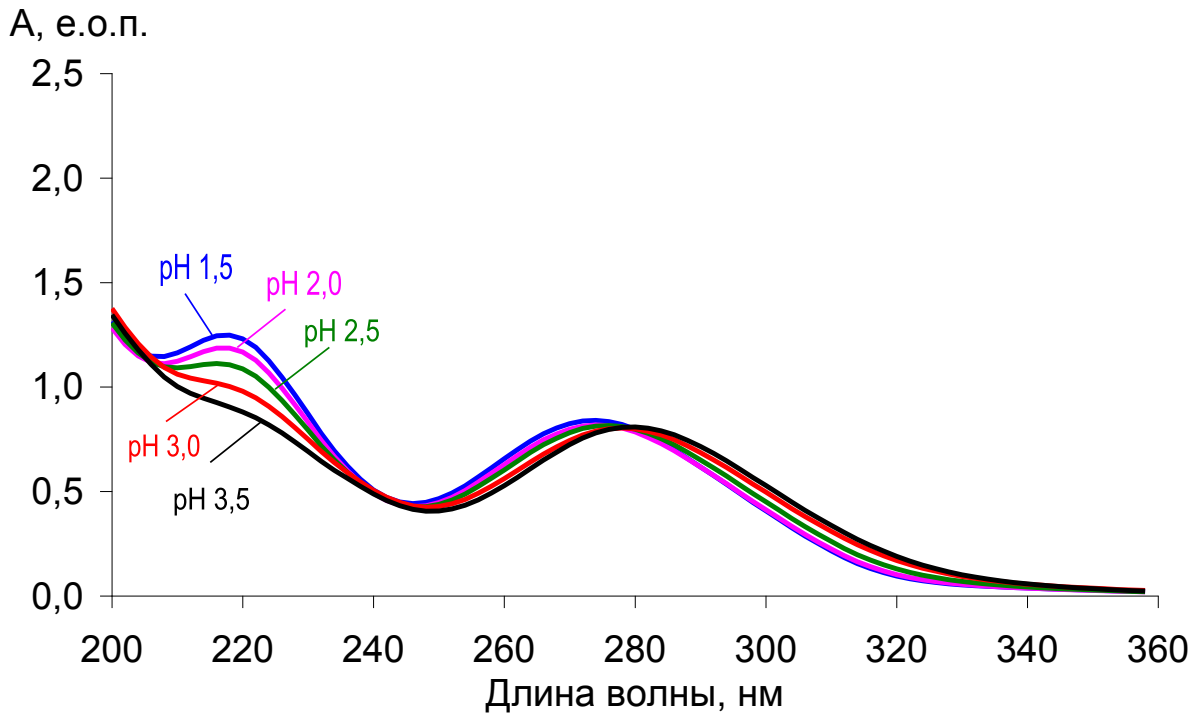
$$R_{pHi} = A_{\max i} / A_{\text{изоб.}}, \quad (3.5)$$

где R_{pHi} – отношение при i -том значении рН ($i=1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5$),

$A_{\max i}$ – значение оптической плотности в максимуме спектра при i -том значении рН, е.о.п.,

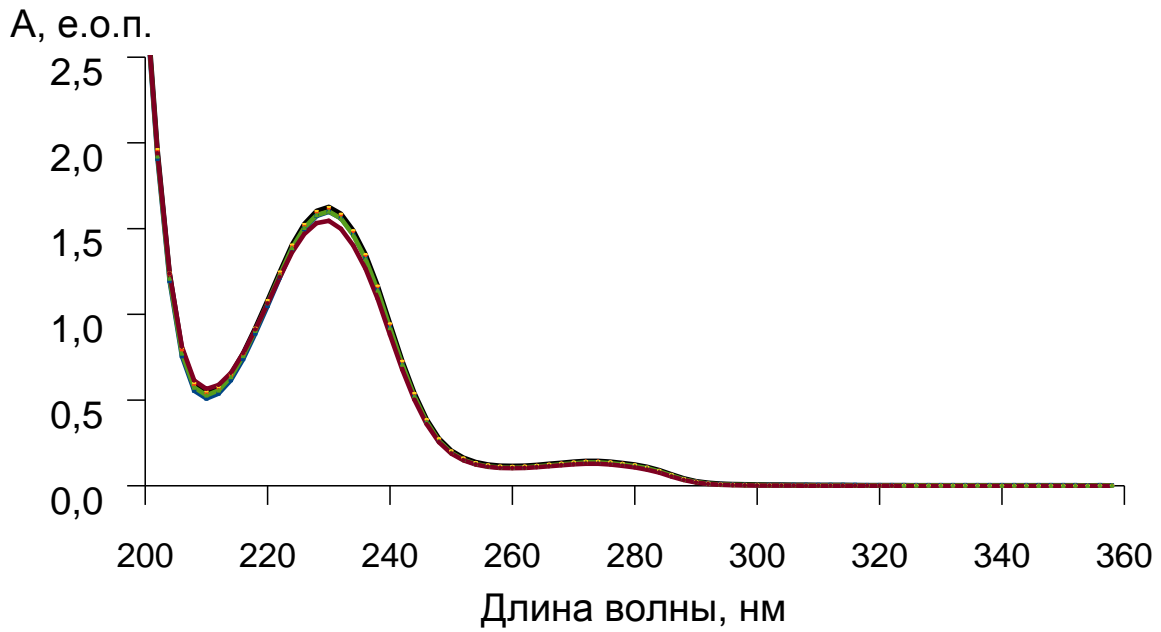
$A_{\text{изоб.}}$ – значение оптической плотности в изобестической точке, е.о.п.

На рисунке 3.8 представлены спектры сравниваемых веществ.



2-хлор-5-нитробензойная кислота

Рисунок 3.8. Спектры веществ, чувствительных к изменению рН, записанные при разных значениях рН элюента. Растворитель: [водный буферный раствор : ацетонитрил] = [75:25]



Бензойная кислота

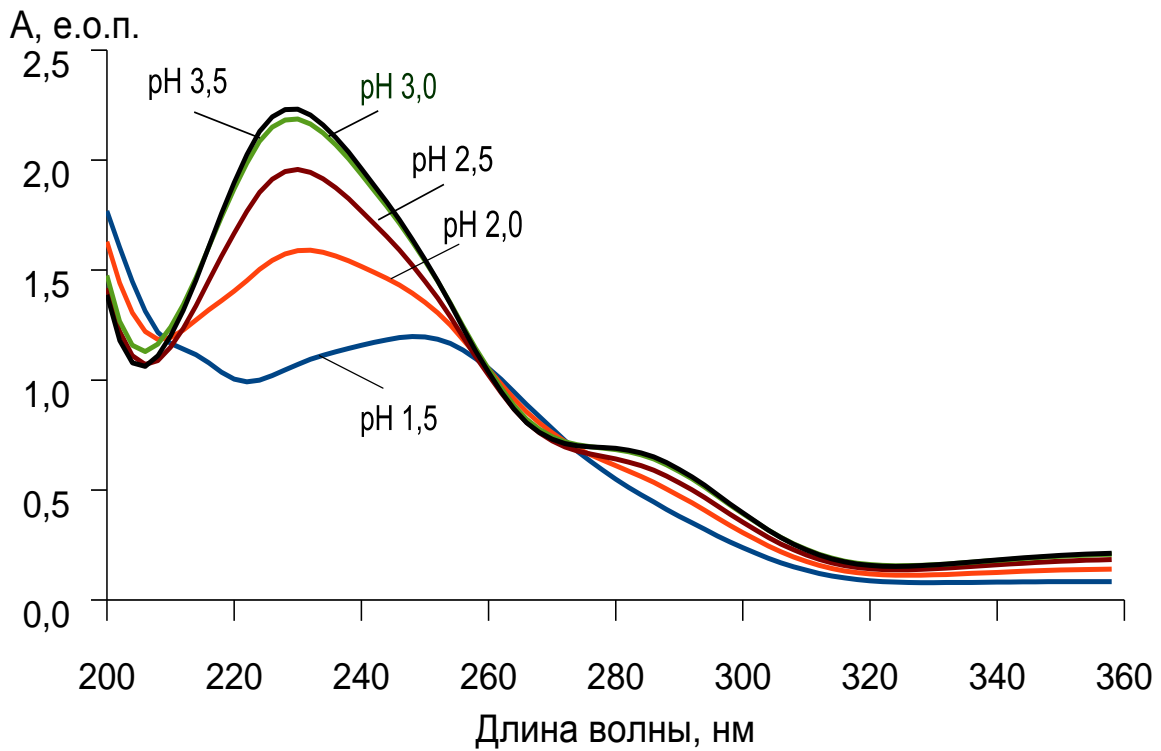
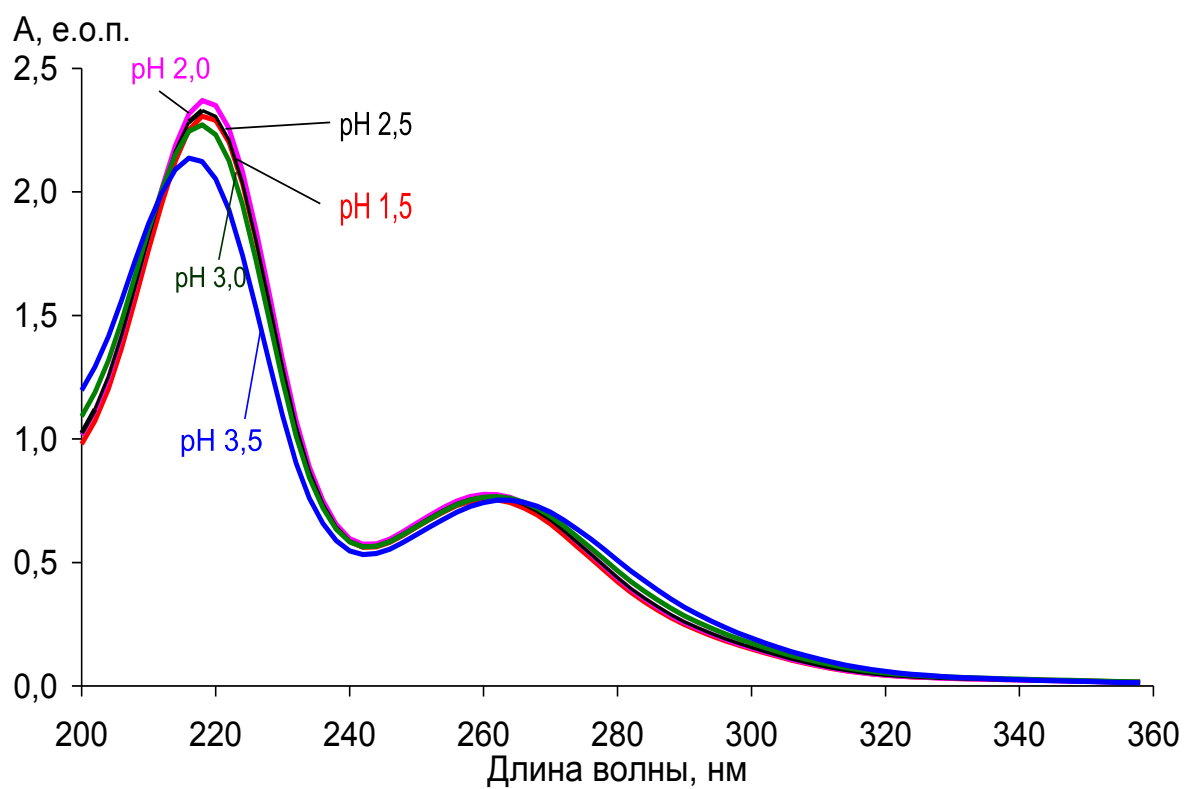
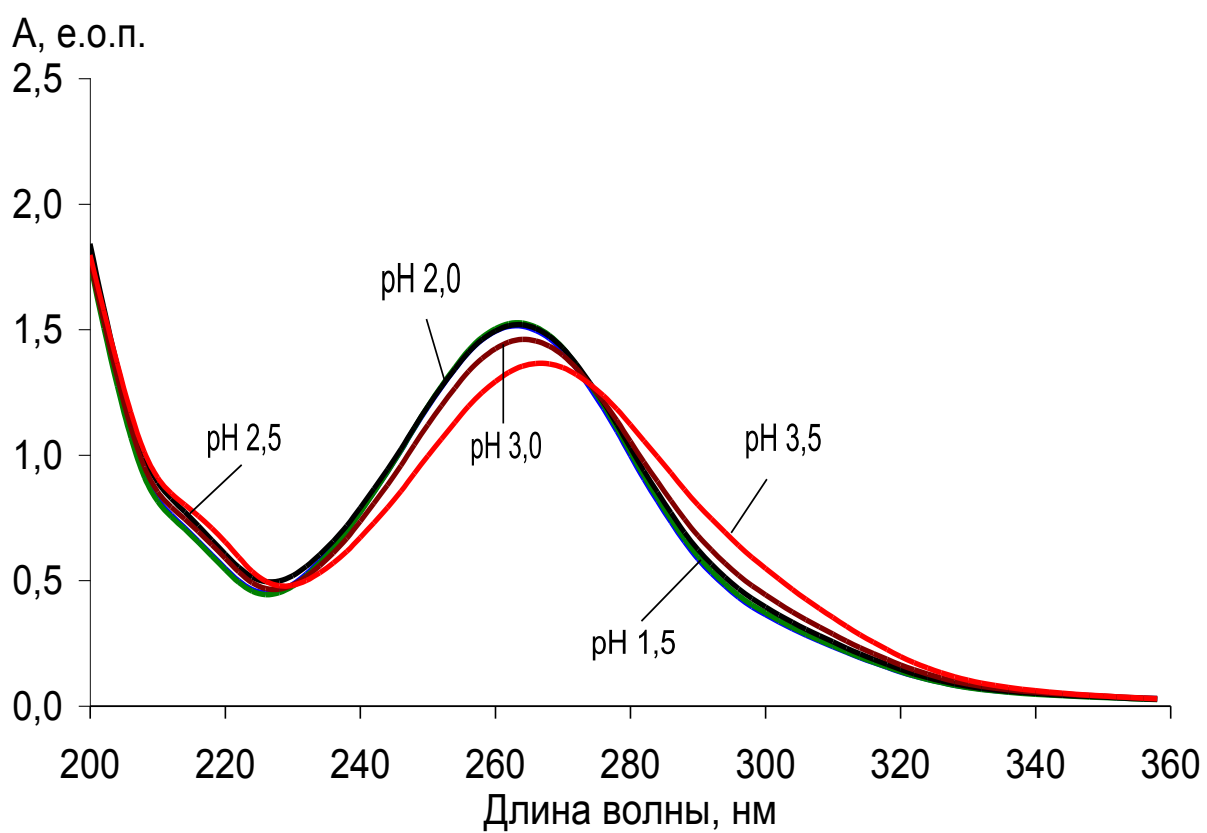
*мета*-Нитроанилин

Рисунок 3.8. (продолжение)

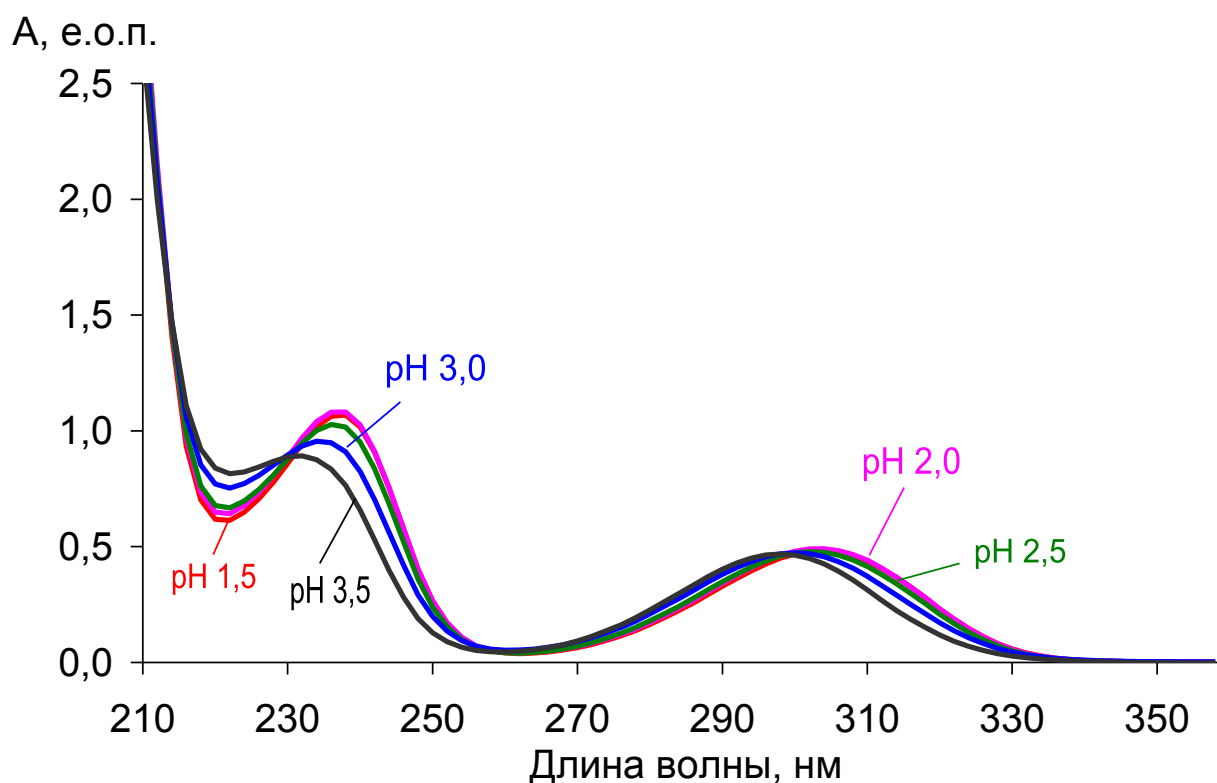


орто-Нитробензойная кислота



пара-Нитробензойная кислота

Рисунок 3.8 (продолжение)



Салициловая кислота

Рисунок 3.8 (окончание)

В таблице 3.5 приведены спектральные отношения *мета*-нитроанилина при различных значениях pH.

Таблица 3.5.

Значения спектрального отношения A_{260}/A_{230} *мета*-нитроанилина при разных значениях pH раствора

pH	pH 1,5	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0	pH 3,5
$R=A_{260}/A_{230}$	0,984	0,661	0,522	0,480	0,464

«Чувствительность» спектра вещества к изменению pH раствора оценивали, сравнивая полученные спектральные отношения при разных значениях pH. Абсолютное значение разности спектральных отношений в точке перегиба (Δ_n) при двух последующих значениях pH рассчитывали по формуле:

$$\Delta_n = |R_{pH_n} - R_{pH_{(n+1)}}|, \quad (3.6)$$

где R_{pHn} и $R_{pH(n+1)}$ – значения спектральных отношений для двух последующих значений рН, вычисленные по формуле (3.5),
 n – порядковый номер значения рН.

Рассчитанные значения Δ_n для каждого из исследованных веществ приведены в таблице 3.6.

Таблица 3.6.

Разность спектральных отношений веществ-маркеров при последовательном изменении рН

Δ_n	Вещества-маркеры значения рН					
	<i>m</i> -Нитро-анилин (A_{260}/A_{230})	2-Хлор-5-Нитро-бензойная кислота (A_{280}/A_{220})	<i>o</i> -Нитро-бензойная кислота (A_{260}/A_{220})	<i>n</i> -Нитро-бензойная кислота (A_{230}/A_{260})	Бензойная кислота (A_{210}/A_{220})	Салициловая кислота (A_{220}/A_{230})
$ R_{pH\ 1,5} - R_{pH\ 2,0} $	0,323	0,024	0,000	0,007	0,017	0,013
$ R_{pH\ 2,0} - R_{pH\ 2,5} $	0,139	0,062	0,002	0,030	0,005	0,039
$ R_{pH\ 2,5} - R_{pH\ 3,0} $	0,042	0,083	0,010	0,009	0,012	0,087
$ R_{pH\ 3,0} - R_{pH\ 3,5} $	0,016	0,102	0,019	0,033	0,036	0,086
Среднее значение разности:	0,130	0,068	0,008	0,020	0,018	0,056

Из 6 исследованных веществ наибольшие изменения УФ спектра раствора в зависимости от рН в интервале от 1,5 до 3,5 наблюдаются для *мета*-нитроанилина. Таким образом, в качестве маркера для контроля значения рН подвижной фазы выбран *мета*-нитроанилин, как вещество, спектральные отношения которого наиболее чувствительны к изменению рН.

3.8 Выбор вещества-маркера для контроля работы смесителя

Работу смесителя контролируют для своевременного обнаружения сбоев в его работе. При смешивании ацетонитрила с водой, когда в первый момент происходит образование ассоциатов "ацетонитрил-вода" важно, чтобы в смесителе эти ассоциаты разрушались, и подвижная фаза становилась истинно гомогенной. При недостаточной эффективности смешивания, которая зависит от объема пассивного смесителя, внутреннего диаметра капилляра, из которого он изготовлен, от степени шероховатости его внутренних стенок и от формы изгибов капилляра, происходит расщепление пиков, что делает невозможным их идентификацию и обработку результатов анализа.

Были исследованы 4 вещества: нафталин, бифенил, пирен и антрацен. Хроматограммы этих веществ представлены на рис. 3.9.

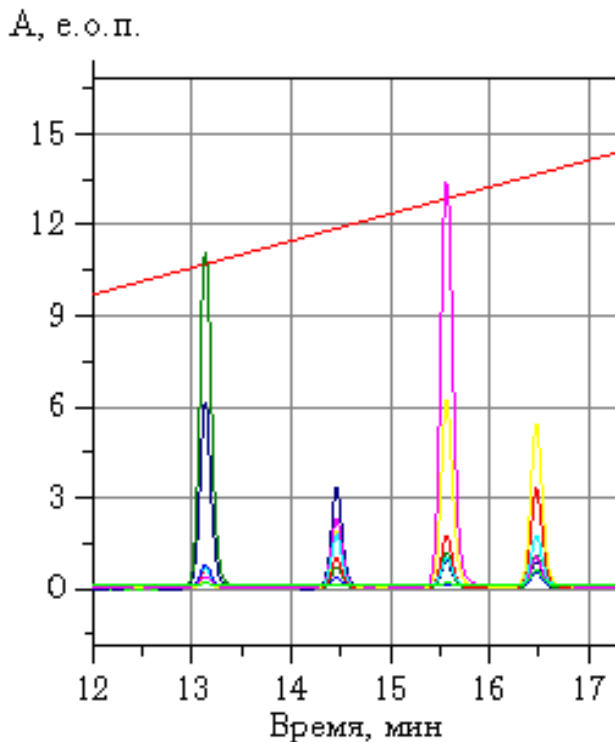


Рис. 3.9а

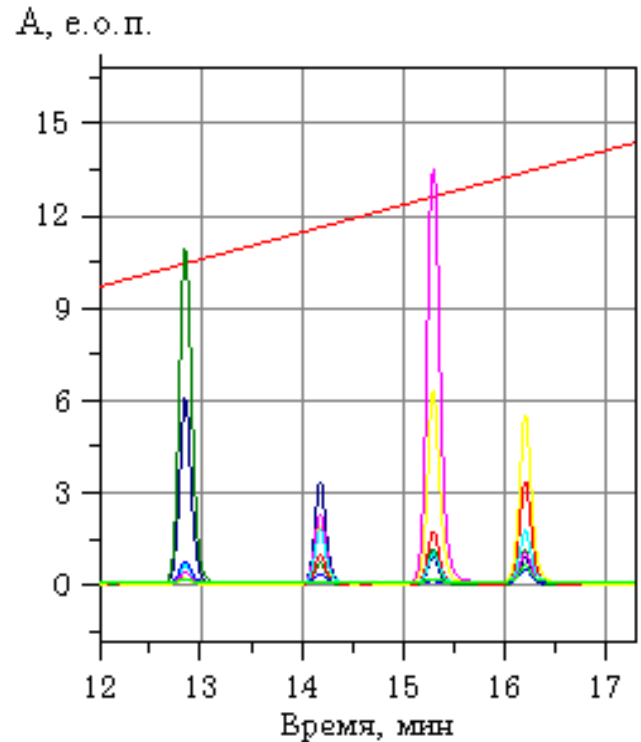


Рис. 3.9б

Рисунок 3.9. Хроматограммы смеси нафталин, бифенил, пирен и антрацен в различных условиях:

3.9а – пассивный смеситель,

3.9б – активный смеситель с включенным электромагнитом,

3.9в – активный смеситель при выключенном электромагните.

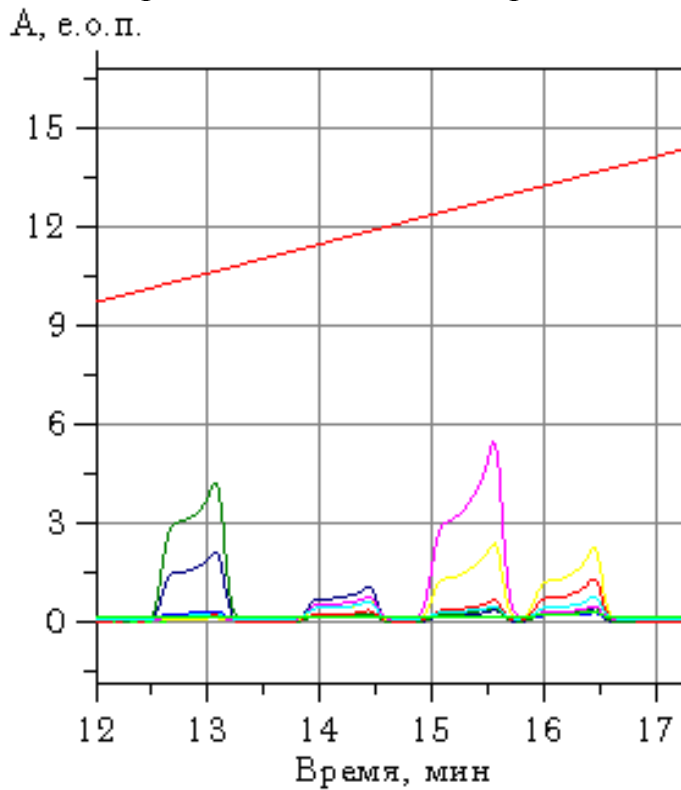


Рис. 3.9в

Были исследованы различные варианты расположения смесителя – с пассивным смесителем, с активным смесителем с включенным электромагнитом, с активным смесителем при выключенном электромагните, т. е при отсутствии принудительного перемешивания.

Проведенные эксперименты показали, что в случае сбоя в работе активного смесителя все исследованные вещества выходят в виде пиков искаженной формы, которые не поддаются обработке и идентификации.

Так как в этом исследовании присутствует пирен, который уже был выбран в качестве маркера по проверке настройки детектора и функционирования насосов, то в качестве маркера работы смесителя также выбран пирен.

Глава 4

Разработка и исследование «тестовой смеси БД-2012»

На основе теоретических и экспериментальных исследований физико-химических свойств сходных по характеристикам веществ выбраны оптимальные, чувствительные к минимальным изменениям контролируемых параметров, вещества:

- йодид калия – для контроля свободного объема колонки;
- пирен – для контроля
 - точности настройки длины волны УФ детектора во всем диапазоне длин волн,
 - функционирования насосов,
 - работы смесителя;
- *орто*-Нитроанилин – для контроля
 - точности настройки детектора в диапазоне (210 – 300) нм,
 - отклонения градиента элюирования от заданной формы,
 - качества упаковки колонки, влияющим на форму пика (асимметрия пика),
 - работы инжектора, который влияет на точность дозирования образца;
- *мета*-Нитроанилин – для контроля качества элюента (значения рН);
- кофеин – для контроля линейного диапазона детектора.

Смесь на основе выбранных веществ приготовлена гравиметрическим методом и аттестована по процедуре приготовления. Характеристики смеси приведены в таблице 4.1. Хроматограмма тестовой смеси показана на рис.4.1.

Метрологические характеристики тестовой смеси

Наименование компонента	Массовая концентрация, мг/мл	Границы относительной погрешности, % (P=0,95)
Калия иодид	0,2	$\pm 1,2$
Пирен	0,2	$\pm 1,0$
Кофеин	2,2	$\pm 0,8$
<i>мета</i> -Нитроанилин	0,2	$\pm 1,2$
<i>орто</i> -Нитроанилин	0,2	$\pm 1,1$
Растворитель: смесь ацетонитрила с водой с объемной долей ацетонитрила 50 %		

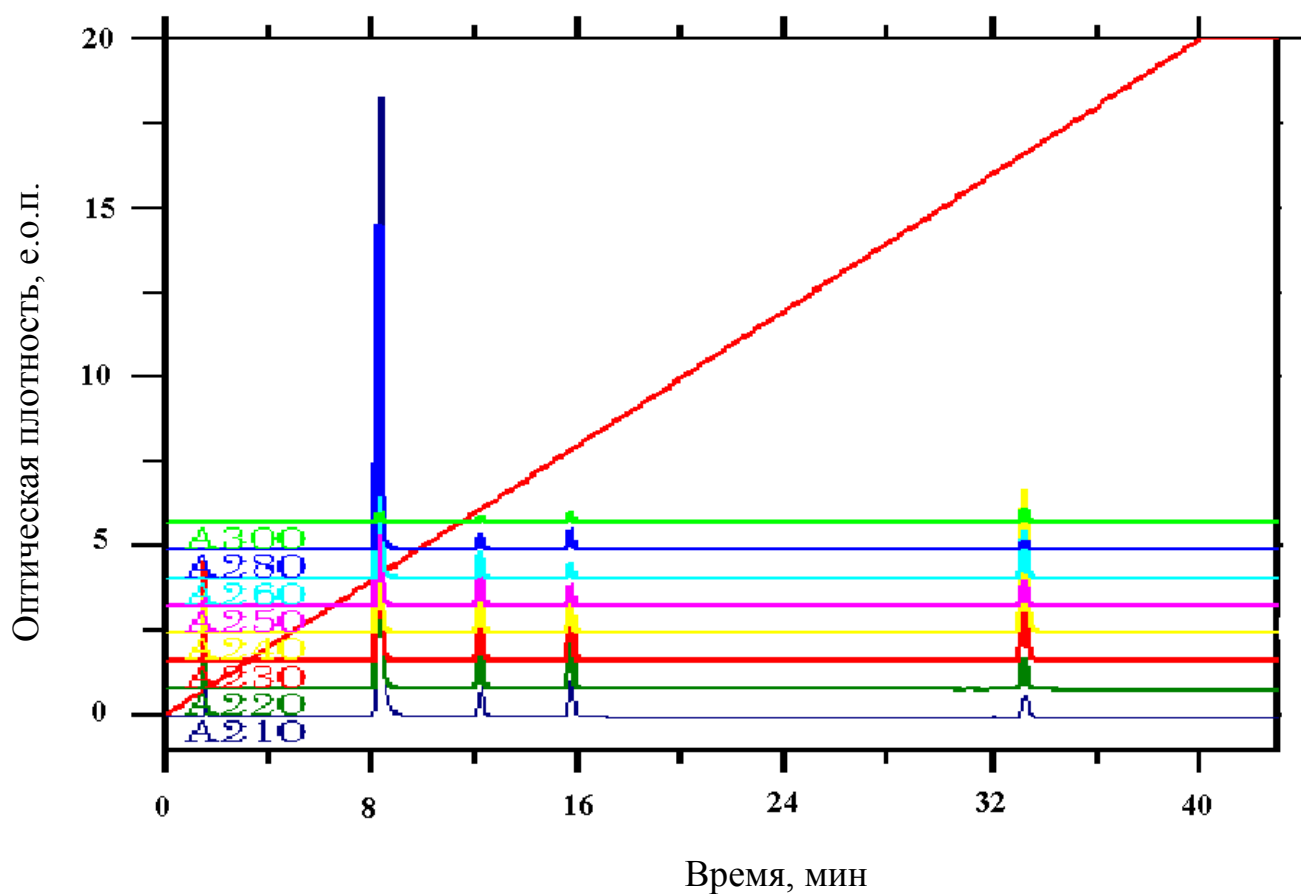


Рисунок 4.1. Хроматограмма тестовой смеси БД-2012

Спектральные и хроматографические параметры, воспроизводимые компонентами смеси БД-2012, и их назначение приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.2

Спектральные и хроматографические параметры компонентов БД-2012

Вещество	Наименование параметра X	Контролируемые характеристики хроматографа
Калия иодид	Объем удерживания, мкл	Свободный объем колонки
Кофеин	Спектральное отношение S_{260}/S_{280}	Линейный диапазон детектора
<i>мета</i> -Нитроанилин	Спектральное отношение S_{260}/S_{230}	Качество элюента А
Пирен	Спектральное отношение S_{220}/S_{210}	Точность настройки детектора во всем диапазоне длин волн
	Спектральное отношение S_{230}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{240}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{250}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{260}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{280}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{300}/S_{210}	
	Объем удерживания, мкл	Работа смесителя
Отклонение градиента от заданной формы		
<i>орто</i> -Нитроанилин	Площадь пика, S_{210}	Точность дозирования образца
	Асимметрия пика, $A_{10\%}$	Нарушения в упаковке колонки

Спектральные характеристики компонентов смеси установлены на основании закона Бугера-Ламберта-Бера; хроматографические (объемы удерживания, высоты, удельные площади и коэффициенты асимметрии пиков) определены на хроматографе «Милихром А-02» экспериментально на

колонке заполненной сорбентом С18, типа БД-2003 при следующих режимных параметрах хроматографа "Милихром А-02":

Элюент "А" – раствор перхлората лития 0,2М LiClO₄-0,005М HClO₄

Элюент "Б" – 100 % ацетонитрил

Длина волны детектора, (λ) 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм

Расход элюента 100 мкл/мин

Температура термостата колонки 40 °С

Постоянная времени 0,18 с

Конфигурация анализа:

промывка иглы "вкл."

промывка инжектора "вкл."

объем буфера "откл."

Метод однолучевой

Режим нормальный

Кювета верхняя

Напряжение переменного тока,

питающего хроматограф 220⁺²²₋₃₃ В

Частота переменного тока (50 ± 1) Гц

Метрологические характеристики спектральных и хроматографических параметров оценены по результатам межлабораторного эксперимента. Пример обработки данных, полученных на трех приборах (в проведении эксперимента участвовали 9 приборов), представлен в таблице 4.3 и на рисунке 4.2.

Таблица 4.3.

Исходные данные						
Прибор 295	КІ	150,48	150,39	150,77	150,35	150,87
	Кофеин	810,97	813,69	815,38	817,77	819,28
	мета- нитроанилин	1207,46	1213,24	1213,50	1215,00	1216,89

	орто- нитроанилин	1552,80	1560,43	1560,65	1562,36	1563,77
	пирен	3320,66	3326,55	3327,42	3327,25	3329,87
Прибор 295						
	КІ	150,70	151,17	151,03	150,85	151,39
	Кофеин	819,97	820,05	819,96	820,56	820,01
	мета- нитроанилин	1216,97	1217,30	1216,30	1217,86	1217,27
	орто- нитроанилин	1563,16	1564,07	1563,13	1563,12	1564,72
	пирен	3328,94	3328,72	3328,52	3328,44	3328,13
Прибор 298						
	КІ	150,32	150,54	150,71	150,76	150,97
	Кофеин	816,45	821,21	822,60	823,05	824,80
	мета- нитроанилин	1209,02	1212,16	1216,91	1219,14	1219,43
	орто- нитроанилин	1547,94	1553,86	1556,80	1558,59	1560,49
	пирен	3314,29	3319,13	3320,88	3323,36	3324,00
Прибор 298						
	КІ	151,14	151,03	150,97	151,06	151,17
	Кофеин	826,64	826,08	826,00	825,79	827,58
	мета- нитроанилин	1221,58	1221,25	1221,35	1221,48	1222,03
	орто- нитроанилин	1561,61	1561,57	1562,17	1562,14	1562,28
	пирен	3324,62	3324,44	3324,80	3324,57	3324,36
Прибор 299						
	КІ	149,88	149,76	149,85	149,42	150,01
	Кофеин	817,14	812,17	813,40	815,18	815,23
	мета- нитроанилин	1215,89	1211,48	1213,19	1215,35	1215,34
	орто- нитроанилин	1568,93	1563,23	1565,84	1567,12	1568,18
	пирен	3322,49	3321,34	3324,42	3325,04	3326,66

Таблица 4.3. (окончание)

Прибор 299	КІ	149,91	151,03	150,51	150,33	150,33
	Кофеин	818,95	816,69	816,49	816,95	816,69
	мета- нитроанилин	1218,02	1216,32	1216,43	1216,73	1216,38
	орто- нитроанилин	1569,99	1570,02	1569,09	1569,09	1566,30
	пирен	3327,06	3326,79	3327,04	3327,06	3326,69

1552,80	1560,43	1560,65	1562,36	1563,77
1547,94	1553,86	1556,80	1558,59	1560,49
1568,93	1563,23	1565,84	1567,12	1568,18
1563,16	1564,07	1563,13	1563,12	1564,72
1561,61	1561,57	1562,17	1562,14	1562,28
1569,99	1570,02	1569,09	1569,09	1566,30
	XmI-Xm	(XmI-Xm)2	XmI	Sml^2
	-0,7307	5,34E-01	1560,002	2,91E+01
	-5,1967	2,70E+01	1555,536	1,75E+01
	5,9273	3,51E+01	1566,660	1,62E+01
	\sum J3:J14=	6,27E+01	\sum Sml^2=	6,29E+01
		L=	3	
		C1=	1560,73	

Рисунок 4.2. Статистическая обработка времени удерживания орто-нитроанилина

Кр.Кохрен:	0,4629		Gтабл=	0,3894				
СКО, характеризующее повторяемость един. анализов, Sr,m :								
Sr,m =	4,58		Sr,m^2 =	20,9589				
Показатель повторяемости - СКО для содержания компонента в ОО, $\sigma_{r,m}$:								
r,m =	4,58		0,3			CR 0,95 при n=4 =	16,6185	
Предел повторяемости для содержания компонента в ОО, $r_{n,m}$:								
$r_{n,m}$ =	12,68		0,8					
Общее среднее значение в условиях воспроизводимости, Xm :								
Xm =	1560,73							
Дисперсия разброса ср. арифм-х единичн. рез-в анализа отн-но общего среднего, Sm^2								
Sm^2 =	31,34	корень=	5,60	$1,2*Sm$ =	6,72	$(1,2*Sm)^2$	4,51E+01	
Выборочная межлабораторная дисперсия результатов анализа ОО, $S_{мл,m^2}$								
$S_{мл,m^2}$ =	29,24							
Выборочное СКО рез-в единичных анализов ОО в условиях внутрилаб. прециз., SR,m								
SR,m =	7,09							
Выборочное СКО результатов анализа ОО в условиях внутрилаб. прециз., SRx,m								
SRx,m =	6,30		Srx,m	6,30	показатель воспроизв методики			
Показатель воспр. методики в виде СКО для содержания компонента в m-том ОО (единичн. анализы), $\sigma_{R,m}$								
R,m =	7,09	0,5	$\sigma_{R,m(\Delta)}$ =	8,50			0,54	
Критическая разность								
			Rm =	18,61	$CD_{0,95}$ =	17,45755		
Показатель воспр-ти методики анализа в виде СКО для содержаний, соотв. содержанию компонента в m-ном ОО, $\sigma_{Rx,m}$								
Rx,m =	6,30	Srx,m =	$\sigma_{Rx,m(\Delta)}$ =	6,30	$\sigma_{Rx,m(\Delta)}^2$	39,72	0,4	
Показатель воспр-ти методики в виде предела воспр-ти для содержаний, соотв. содержанию компонента в m-ном ОО, RkX,m								
RkX,m =	17,46					17,45755		

Рисунок 4.2. (окончание)

В таблице 4.4. приведены метрологические характеристики спектральных и хроматографических параметров веществ, входящих в состав тестовой смеси.

Таблица 4.4.

Метрологические характеристики спектральных и хроматографических параметров веществ, входящих в состав тестовой смеси

Вещество	Наименование параметра	Аттестованное значение параметра	Границы относительной погрешности, %, P=0,95	Предел повторяемости, %, r (n=2, P=0,95)	Предел воспроизводимости, %, R (m=2, P=0,95)
1	2	3	4	5	6
Калия иодид	Объем удерживания, мкл	144	± 1	0,2	0,6
Кофеин	Спектральное отношение S_{260}/S_{280}	0,76	± 2	2	2

Продолжение таблицы 4.4.

1	2	3	4	5	6
<i>мета-</i> Нитроани лин	Спектральное отношение S_{260}/S_{230}	0,60	± 4	2	3
Пирен	Объем удерживания, мкл	3301	± 2	1	2
	Спектральное отношение S_{220}/S_{210}	1,1	± 2	1	3
	Спектральное отношение S_{230}/S_{210}	3,5	± 4	5	5
	Спектральное отношение S_{240}/S_{210}	6,0	± 3	2	4
	Спектральное отношение S_{250}/S_{210}	1,1	± 1	1	1
	Спектральное отношение S_{260}/S_{210}	1,9	± 2	1	1
	Спектральное отношение S_{280}/S_{210}	0,4	± 1	1	2
	Спектральное отношение S_{300}/S_{210}	0,6	± 2	1	2
<i>орто-</i> Нитроани лин	Объем удерживания, мкл	1525	± 4	2	4
	Выходной сигнал, S_{210} , е.о.п.·мкл	24,8	± 4	3	6
	Асимметрия пика, $A_{10\%}$	1,0	± 7	3	8

Глава 5

Разработка и аттестация методики идентификации и количественного определения УФ поглощающих веществ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

5.1. Методика идентификации и количественного определения УФ поглощающих веществ

На основе метода идентификации с применением тестовой смеси и БД ВЭЖХ УФ принципиально впервые предложенном Барамом Г.И. и заключающемся в:

- контроле параметров хроматографа с использованием тестовой смеси;
 - оценивании по полученной хроматограмме тестовой смеси соответствия экспериментальных значений всех контролируемых параметров значениям этих параметров;
 - проведении хроматографического анализа исследуемого образца в тех же условиях, что и анализ тестовой смеси;
 - проведении предварительной идентификации анализируемого вещества по объему удерживания и окончательной – по спектрам (спектральным отношениям) предполагаемых веществ-кандидатов;
 - количественном определении содержания вещества в анализируемом образце при положительном результате идентификации с применением базы данных, содержащей хроматографические и спектральные параметры более 500 органических и неорганических соединений,
- и на основании проведенных автором диссертации исследований, изложенных в главах 3 и 4, автором диссертации разработана методика идентификации и количественного определения УФ-поглощающих веществ методом жидкостной хроматографии с применением смеси БД-2012.

Методика регламентирует процедуру идентификации и выполнения измерений массовой концентрации УФ-поглощающих веществ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенно-фазовом режиме с детектированием на 8 длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм.

Методика предназначена для идентификации индивидуальных УФ-поглощающих веществ с целью подтверждения их подлинности и для определения их массовой концентрации. Высота пика определяемого вещества при переводе его в раствор с массовой концентрацией 0,2 мг/мл должна находиться в диапазоне (1-10) е.о.п. при регистрации на длине волны 210 нм.

Режимные параметры хроматографа устанавливаются и контролируются по аттестованной смеси «БД-2012», заменяя, таким образом, процедуру традиционной градуировки, которую необходимо было бы выполнять перед каждым анализом с использованием индивидуальных образцов для градуировки.

Процедура контроля хроматографа заключается в воспроизведении на нем хроматографических и спектральных параметров компонентов аттестованной смеси «БД-2012» в пределах установленных для них погрешностей (табл.4.3). Программа автоматически рассчитывает расхождения между полученными экспериментальными значениями хроматографических и спектральных параметров (X_i) и соответствующими аттестованными значениями параметрами, установленными для аттестованной смеси «БД-2012» (X_{i0} БД-2012).

Полученные расхождения не должны превышать значение предела воспроизводимости (R_i), установленное для каждого параметра смеси «БД-2012» (Таблица 4.4).

Если условие

$$\frac{|X_{iБД-2012} - X_{i0БД-2012}| \cdot 200}{|X_{iБД-2012} + X_{i0БД-2012}|} \leq R_{i2012} \quad (5.1)$$

выполняется для всех параметров, то хроматографическая система считается пригодной для использования данной методики.

Если условие (5.1) не выполняется, то требуется настройка режимных параметров хроматографа в соответствии с руководством по эксплуатации и методикой измерений.

При выполнении условия (5.1) анализируют пробу в соответствии с методикой измерений.

После проведения серии анализов повторяют анализ смеси «БД-2012». Если для смеси «БД-2012» выполняется условие

$$\frac{|X_{iБД-2012} - X_{i0БД-2012}| \cdot 200}{|X_{iБД-2012} + X_{i0БД-2012}|} \leq r_{i2012}, \quad (5.2)$$

то переходят к обработке результатов измерений хроматографических и спектральных параметров компонентов анализируемых проб.

Если условие (5.2) не выполняется, то результаты анализов серии исследуемых образцов считаются непригодными для обработки; требуется настройка режимных параметров хроматографа в соответствии с руководством по эксплуатации хроматографа и методикой измерений.

Полученную хроматограмму обрабатывают с помощью программы обработки данных, которая вычисляет объем удерживания, спектральные отношения, высоту, площадь и коэффициент асимметрии пика исследуемого вещества.

Идентификацию и расчет массовой концентрации проводят путем сравнения полученных данных с аналогичными данными, содержащимися в хроматографической базе данных.

Находят в базе данных вещество (вещества) с объемом удерживания ($V_{БД-2012}$), соответствующим найденному ($V_{ан}$) в границах погрешности (Δ_V) установления значения $V_{БД-2012}$

$$V_{БД-2012} - \Delta_V \leq V_{ан} \leq V_{БД-2012} + \Delta_V, \quad (5.3)$$

где $\Delta_V = \pm 0,01 \delta_V \cdot V_{БД-2012}$;

$\pm\delta_v$ - границы относительной погрешности, установленные для значения $V_{\text{БД-2012}}$. Значения $\pm\delta_v$ приведены в базе данных.

Сравнивают значения спектральных отношений анализируемого вещества и вещества (веществ), удовлетворяющего условию (5.3).

Если все хроматографические и спектральные параметры анализируемого вещества соответствуют в пределах погрешности веществу, найденному в базе данных (5.3), то вещество считается идентифицированным.

$$X_{i_{\text{БД-2012}}} - \Delta_{X_{i_{\text{БД-2012}}}} \leq X_{i_{\text{ан}}} \leq X_{i_{\text{БД-2012}}} + \Delta_{X_{i_{\text{БД-2012}}}}, \quad (5.4)$$

где

$$\Delta_{X_{i_{\text{БД-2012}}}} = \pm 0,01 \delta_{X_{i_{\text{БД-2012}}}} \cdot X_{i_{\text{БД-2012}}};$$

$\pm\delta_{X_{i_{\text{БД-2012}}}}$ - границы относительной погрешности, установленные для значения $X_{i_{\text{БД-2012}}}$. Значения $\pm\delta_{X_{i_{\text{БД-2012}}}}$ приведены в базе данных.

Рассчитывают массовую концентрацию (C_j , мг/мл) анализируемого вещества в пробе по соотношению

$$C_j = \frac{S_{210j_{\text{ан}}}}{S_{a210j_{\text{БД-2012}}}}, \quad (5.5)$$

где

- $S_{210j_{\text{ан}}}$ - значение площади пика j-го компонента, о.е.п.·мкл;

- $S_{a210j_{\text{БД-2012}}}$ удельная площадь пика вещества "j" из базы данных,

$$\frac{\text{о.е.п.} \cdot \text{мкл}}{\text{мг} / \text{мл}}.$$

Метрологические характеристики методики установлены по результатам межлабораторного эксперимента и приведены в таблице 5.1.

Метрологические характеристики методики идентификации и количественного определения УФ-поглощающих веществ методом жидкостной хроматографии

№ п/п	Наименование параметра	Диапазон измерений	Показатель точности (границы погрешности измерений) при P=0,95		Предел повторяемости, (n=2, P=0,95)		Предел воспроизводимости, (m=2, P=0,95)	
			относит., $\delta, \%$	абсолют., Δ	относит., $r, \%$	абсолют., $r_{\text{абс}}$	относит., $R, \%$	абсолют., $R_{\text{абс}}$
1	Массовая концентрация, мг/мл	0,2	± 8		4		8	
2	Удельная площадь пика S_{a210} , <u>е.о.п.·мкл</u> мг/мл	125-1250	± 4		3		5	
3	Объем удерживания V_R , мкл	150-4300	± 7		4		8	
4	Спектральное отношение S_{λ} / S_{210}	0,10-1,00 св.1,00-10,0	± 4	$\pm 0,03$	4	0,02	8	0,03
5	Площадь пика S_{210} , <u>е.о.п.·мкл</u>	25-250	± 3		3		5	

5.2. Источники ошибок идентификации и минимизация их влияния путем применения тестовой смеси

Принимая во внимание характерные источники ошибок идентификации [42], при разработке применения тестовой смеси «БД-2012» были предприняты действия, направленные на минимизацию влияния большей части причин возникновения ошибок.

Характерные причины возникновения ошибок идентификации.

а) Сдвиг пика пробы

Влияние на результат идентификации случайного сдвига пика пробы, как правило, обусловленного колебаниями скорости потока элюента, нестабильностью температуры, низкой повторяемостью объема вводимой пробы [42] минимизировано с помощью следующих шагов:

- контроль по объему удерживания *орто*-нитроанилина скорости потока элюента и отклонения градиента от заданной формы дает представление о точности работы насосов;

- термостатирование колонки значительно уменьшает колебания температуры колонки;

- контроль значений спектральных отношений *мета*-нитроанилина позволяет оценивать даже незначительные отклонения рН элюента от заданного;

- контроль стабильности значения площади пика *орто*-нитроанилина дает возможность поддерживать постоянным объем вводимой пробы и оценивать и контролировать работу инжектора.

б) Невысокое значение межлабораторной воспроизводимости и непостоянство характеристик удерживания

Значения времени удерживания не являются константами, а изменяются при переходе от анализа на одной колонке к анализу на другой с той же стационарной фазой. Ценность характеристик удерживания в качестве

признаков идентификации может снизиться из-за их зависимости от влияния изменения объема вводимой пробы и ее состава [42]. Известны случаи влияния изменения объема вводимой пробы на значение индекса удерживания. Так, например, изменение в 3 раза объема (с использованием полярной стационарной фазы) приводило к сдвигу индекса удерживания на 30-35 единиц, в то время как хроматограф, колонка и методика проведения анализа не менялись. Изменение в 2-3 раза отношения концентраций анализируемого вещества и ближайшего к нему по времени удерживания н-алкана при постоянном объеме вводимой пробы иногда приводило к сдвигу индекса удерживания на 5-10 единиц [87]. Такие случаи – скорее редкое исключение, но необходимо принимать во внимание, что разные компоненты сложной пробы иногда различаются по индексу всего на 1-2 единицы [88].

Для минимизации влияния этих причин возникновения ошибок уделяют пристальное внимание изготовлению и наполнению колонок. Сорбент для хроматографических колонок жидкостных хроматографов серии Милихром А-02 изготавливаются из одной партии. «Одна» партия сорбента получается путем смешивания минимум 4 идентичных, но полученных в разное время как можно больших по весу и объему партий сорбента, объема которых хватает для набивки примерно 1000 - 2000 колонок. То есть, геометрические размеры и форма, пористость сорбента практически не меняется от колонки к колонке. На стадии изготовления колонок до их набивки тщательно контролируются геометрические размеры и качество внутренней обработки колонок. Таким образом, достигается отклонение геометрических и хроматографических характеристик колонок не более чем на $\pm 0,1$ % от колонки к колонке.

в) Случайные совпадения характеристик удерживания различных веществ

Влияние случайных совпадений становится значимым при анализе сложных органических соединений. Минимизируется этот источник ошибок использованием для целей идентификации не только одного

идентификационного признака, а большего их числа. В случае БД-2012 признаков идентификации вещества восемь, и они достаточно полно определяют параметры удерживания и спектр УФ поглощающего анализируемого вещества.

Глава 6

Оценка достоверности идентификации

6.1 Теоретические аспекты идентификации

Каждое химическое вещество обладает уникальной молекулярной структурой, определение которой возможно посредством измерения его физико-химических свойств с применением подходящих методов и средств. Распространенными методами определения состава веществ являются высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газо-жидкостная хроматография, масс-спектрометрия. При этом одной из основных задач, решаемых при хроматографическом анализе, является задача идентификации веществ в анализируемых пробах. Как по поставленной цели, так и по используемым методам достижения этой цели идентификация представляет собой частную задачу более общей проблемы распознавания образов, т.е. проблемы классификации и идентификации явлений, сигналов, объектов, которые характеризуются конечным набором свойств и признаков.

Одним из самых распространенных способов, используемых при идентификации, в последнее время стал способ, основанный на использовании для этих целей баз данных (БД). Таким образом, в случае анализа пробы, например, методом ВЭЖХ с применением БД вещество считается идентифицированным, если имеется однозначное совпадение характеристик анализируемого компонента с характеристиками одного из веществ БД.

Прежде чем переходить к изложению решения поставленной задачи, необходимо привести основные понятия, которые будут использоваться в дальнейшем.

При идентификации рассматривают данные двух типов [89].

Данные первого типа – данные из базы данных (БД-2012), полученные путем хроматографирования и записи спектра стандартных образцов состава чистых веществ или чистых веществ из надежных источников с содержанием основного вещества не менее 98 % и с известным содержанием примесей.

БД-2012 содержит средние значения характеристик $a_R(i, j)$, ($i = 1, 2, \dots, m$, $j = 1, 2, \dots, k$), индекс i нумерует вещества в базе (их предполагается m), j нумерует характеристики (их для каждого i го вещества предполагается k). В рассматриваемом случае характеристики веществ это объем удерживания и спектральные отношения, определяемые по экспериментально измеренным ультрафиолетовым спектрам. При этом каждой характеристике - объему удерживания и спектральному отношению, соответствуют значения $\sigma_R(i, j)$ и допуски $d(i, j)$ на их значения. Рекомендуемый интервал, в котором должны находиться допуски [42], приведен ниже

$$2\sigma_R(i, j) < d(i, j) < 3\sigma_R(i, j). \quad (6.1)$$

Не все характеристики веществ в базе данных равноценны. Среди них необходимо выделить, в первую очередь, объем удерживания $V_R(i, 1)$, по которому происходит основная идентификация, которой в благоприятных случаях все может и ограничиться.

Данные второго типа – это экспериментально измеренные характеристики веществ $x(i)$, такие как средние значения объемов удерживания, спектральные отношения $b_x(i, j)$ и соответствующие значения среднего квадратического отклонения $\sigma_x(i, j)$.

Для того, чтобы иметь возможность применить статистические методы к идентификации необходимо ввести границы применимости теории.

В данной работе мы говорим об определении достоверности идентификации веществ в рамках существующей базы данных, содержащей характеристики 500 веществ и соединений. В данном аспекте достоверность

идентификации вещества из всего многообразия соединений, существующих в природе и синтезированных, не рассматривается.

Основное предположение, позволяющее оценивать достоверность идентификации, сводится к тому, что значения характеристик веществ при измерениях ведут себя как случайные величины, а их распределения являются нормальными. Однако следует признать, что сама характеристика анализируемого вещества (объем удерживания или спектральное отношение) не может быть случайной для него величиной. В то же время разность времен удерживания или соответствующих спектральных отношений на одной и той же длине волны у двух различных веществ уже будет случайной величиной, и к ней уже можно применять методы математической статистики.

Важным аспектом идентификации является выбор меры подобия или различия между измеренным параметром и находящимся в базе данных.

Мерой различия для рассматриваемого случая является сдвиг (невязка) $\Delta_x(i, j)$ между измеренным средним значением характеристики (например – временем удерживания) и средним значением этой характеристики в базе данных, т.е.

$$\Delta_x(i, j) = |a_R(i, j) - b_x(i, j)|. \quad (6.2)$$

Идентификация считается результативной, если разница между измеренным значением характеристики и приведенным в БД будет не больше некоторого критерия (в нашем случае – допуска на это значение), то есть если выполняется условие

$$\Delta_x(i, j) \leq d(i, j). \quad (6.3)$$

Условие (6.3) является необходимым, но не достаточным для однозначной идентификации.

6.2 Определение вероятностей ошибок первого и второго рода

При проведении идентификации формулируются статистические гипотезы H_0 (нулевая гипотеза) и H_1 (альтернативная гипотеза).

В нашем случае нулевая гипотеза H_0 заключается в утверждении об отсутствии вещества в пробе.

Если при этом результат измерения показал наличие вещества в пробе, т.е. из-за погрешности измерений его результат удовлетворяет условию (6.3), и если на основании такого измерения принимается решение о наличии вещества в пробе, то совершается *ошибка 1го рода* (ложноположительный результат, false positive). Другими словами, при ошибке 1го рода гипотеза H_0 отвергается и принимается гипотеза H_1 .

Вероятность ошибки 1го рода обозначается через α . Таким образом, α - это вероятность принятия альтернативной гипотезы, которая называется *уровнем значимости*.

Альтернативная ситуация заключается в справедливости гипотезы H_1 .

Если при этом результат измерения показал отсутствие вещества в пробе, т.е. из-за погрешности измерений его результат не удовлетворяет условию (5.3), и если на основании такого измерения принимается решение об отсутствии вещества в пробе, то совершается *ошибка 2го рода* (ложноотрицательный результат, false negative). Другими словами, при ошибке 2го рода гипотеза H_1 отвергается и принимается гипотеза H_0 .

Вероятность ошибки 2го рода обозначается через β . С этой вероятностью связана другая величина – *мощность критерия M*. Она вычисляется по формуле

$$M = 1 - \beta. \quad (6.4)$$

В частности, вероятность ошибки 1го рода α есть функция мощности M , вычисленная при нулевой гипотезе.

Для наглядности, описанные выше ситуации можно представить в виде таблицы 6.1.

Таблица 6.1.

Ошибки первого и второго рода

Истинная ситуация	Результат идентификации	Характер ошибки
Определяемое вещество в пробе <u>отсутствует</u> (H_0)	Идентификация дает <u>отрицательный</u> результат	Ошибка <u>отсутствует</u> (гипотеза H_0 принимается)
Определяемое вещество в пробе <u>отсутствует</u> (H_0)	Идентификация дает <u>положительный</u> результат	<u>Ошибка 1го рода</u> (ложноположительный результат) (гипотеза H_0 отвергается, принимается гипотеза H_1)
Определяемое вещество в пробе <u>присутствует</u> (H_1)	Идентификация дает <u>отрицательный</u> результат	<u>Ошибка 2го рода</u> (ложноотрицательный результат) (гипотеза H_1 отвергается, принимается гипотеза H_0)
Определяемое вещество в пробе <u>присутствует</u> (H_1)	Идентификация дает <u>положительный</u> результат	Ошибка <u>отсутствует</u> (гипотеза H_1 принимается)

Достоверность идентификации определяется функцией P , связанной с вероятностями α и β соотношением

$$P = 1 - \alpha - \beta. \quad (6.5)$$

Функцию P нельзя полностью отождествлять с вероятностью правильной идентификации. На самом деле она может принимать значения от -1 до $+1$ в зависимости от значений α и β .

Отрицательные значения P получаются тогда, когда $\alpha + \beta > 1$, например, когда $\alpha = 0,5$, а $\beta = 0,6$.

Идеальная идентификация ($P = 1$) при этом отвечает случаю $\alpha + \beta = 0$, т.е. случаю, когда все ошибки идентификации отсутствуют, что в принципе невозможно.

Случай $P = 0$ (совершенно неверная идентификация) соответствует, например, ситуации, когда вещество в пробе отсутствует, а вероятность его ложной идентификации максимальна (смотри далее), либо когда $\alpha + \beta = 1$.

Только тогда, когда $0 < P < 1$, эту функцию условно можно отождествить с вероятностью правильной идентификации. Несмотря на условный характер этой функции, ее можно использовать в качестве количественной характеристики правильности идентификации.

Необходимо отметить, что приведенные выше понятия и определения известны достаточно хорошо и приведены, например, в работе [4].

Применим изложенную выше теорию к анализу конкретных экспериментальных данных.

Итак, хроматограмму приближенно можно считать кривой, подчиняющейся нормальному распределению Гаусса.

Ее функция плотности вероятности имеет вид

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(x-b_x)^2}{2\sigma^2}} \quad (6.6)$$

С учетом свойств случайной величины, имеющей нормальный закон распределения, исходная формула для вычисления этих вероятностей имеет вид

$$P(X_1 < X < X_2) = \Phi\left(\frac{X_2 - b_x}{\sigma_x}\right) - \Phi\left(\frac{X_1 - b_x}{\sigma_x}\right), \quad (6.7)$$

где $\Phi(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_0^x e^{-\frac{z^2}{2}} dz$ - функция Лапласа, σ_x - СКО измеряемой характеристики, b_x - среднее значение (математическое ожидание) этой характеристики.

Полезные свойства функции Лапласа:

$\Phi(0) = 0$, $\Phi(-x) = -\Phi(x)$ (нечетная функция), $\Phi(3 \div 4) \approx \Phi(\infty) = 0,5$.

Рассмотрим подробнее получение формул для определения ошибок первого и второго рода.

Ошибка 1го рода возникает тогда, когда вещество в анализируемой пробе отсутствует, но измерение показывает его присутствие. Это означает, что, хотя сдвиг среднего значения измеряемой характеристики относительно базового и не удовлетворяет условию (6.3), однако из-за погрешности измерений («хвоста» функции распределения плотности вероятности), результаты измерения могут оказаться в пределах допуска.

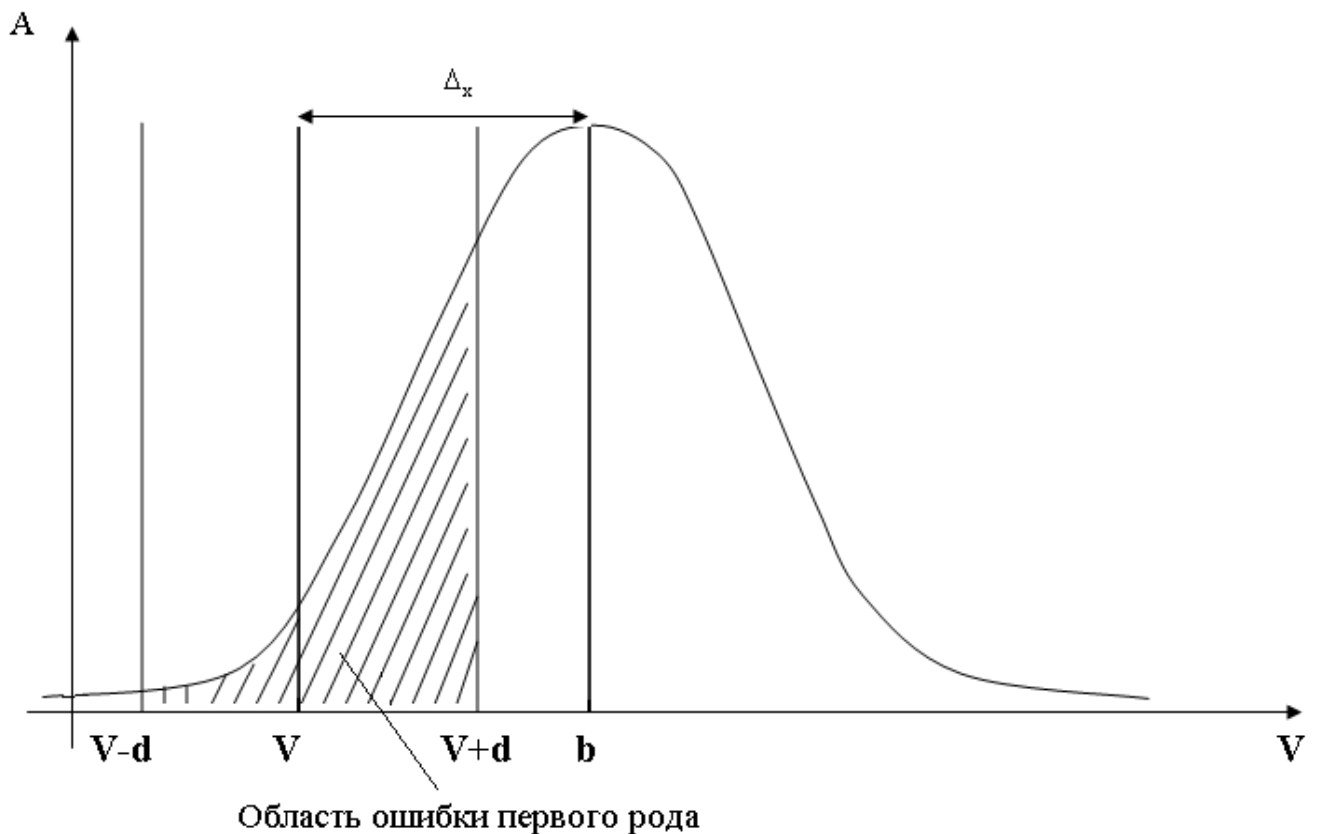


Рисунок 6.1. Ошибка первого рода

Сдвиг Δ_x , полученный как разница между результатом измерения объема (времени) удерживания идентифицируемого вещества b и значением V_R , приведенным в базе данных, удовлетворяет условию идентификации, хотя на самом деле вещество в пробе отсутствует. Получаем ложноположительную идентификацию.

Найдем вероятность ошибки первого рода.

Вероятность того, что b попадает в интервал от V_R-d_R до V_R+d_R на основании свойств функции плотности вероятности будет равна:

$$P((V_R-d_R) < b < (V_R+d_R)) = \frac{1}{\sigma_x \sqrt{2\pi}} \int_{V_R-d_R}^{V_R+d_R} e^{-\frac{(b-V_R)^2}{2\sigma_x^2}} db =$$

Сделаем замену переменных $z = \frac{b-V_R}{\sigma_x}$,

нижний предел интеграла $\frac{b-V_R-d_R}{\sigma_x}$,

верхний предел интеграла $\frac{b-V_R+d_R}{\sigma_x}$, и $\Delta_x = b - V_R$, продолжим преобразования

$$= \frac{\sigma_x}{\sigma_x \sqrt{2\pi}} \int_{\frac{b-V_R-d_R}{\sigma_x}}^{\frac{b-V_R+d_R}{\sigma_x}} e^{-\frac{z^2}{2}} dz = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{\frac{\Delta_x-d_R}{\sigma_x}}^{\frac{\Delta_x+d_R}{\sigma_x}} e^{-\frac{z^2}{2}} dz =$$

Применим еще одну замену переменных $a = \frac{\Delta_x-d_R}{\sigma_x}$ и $b = \frac{\Delta_x+d_R}{\sigma_x}$ и получим

$$= \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_a^b e^{-\frac{z^2}{2}} dz = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_a^0 e^{-\frac{z^2}{2}} dz + \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_0^b e^{-\frac{z^2}{2}} dz = \text{применяя свойства интегралов,}$$

$$\text{получим} \quad = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_0^b e^{-\frac{z^2}{2}} dz - \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_0^a e^{-\frac{z^2}{2}} dz =$$

Применим функцию Лапласа $\Phi(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_0^x e^{-\frac{t^2}{2}} dt$ и получим

$$= \Phi(b) - \Phi(a) = \Phi\left(\frac{\Delta_x+d_R}{\sigma_x}\right) - \Phi\left(\frac{\Delta_x-d_R}{\sigma_x}\right) \quad (6.8)$$

Вероятность ошибки первого рода – того, что b попадает в интервал от V_R-d_R до V_R+d_R –

$$\alpha = P((V_R - d_R) < b < (V_R + d_R)) = \Phi\left(\frac{\Delta_x + d_R}{\sigma_x}\right) - \Phi\left(\frac{\Delta_x - d_R}{\sigma_x}\right) \quad (6.9)$$

В общем случае вероятность ошибки 1го рода вычисляется по формуле

$$\alpha = \Phi\left(\frac{\Delta_x + d_R}{\sigma_x}\right) - \Phi\left(\frac{\Delta_x - d_R}{\sigma_x}\right) \quad (6.10)$$

Максимальное значение ошибки 1го рода получится тогда, когда среднее значение b_x совпадает с базовым средним, т.е. когда $\Delta_x = 0$.

Формула для ее вычисления имеет вид

$$\alpha_{\max} = 2\Phi\left(\frac{d_R}{\sigma_x}\right). \quad (6.11)$$

Формула (6.11) следует из (6.10) при учете нечетности функции Лапласа.

Если $d_R = 2\sigma_x$, то $\alpha_{\max} \approx 2\Phi(2) = 0,95$, т.е. вероятность действительно максимальна. Что касается минимального значения этой ошибки, то его можно оценить по формуле

$$\alpha_{\min} \approx 0,5 - \Phi\left(\frac{\Delta_x - d_R}{\sigma_x}\right), \quad (6.12)$$

при этом численное значение зависит от конкретного выбора параметров Δ_x и d_R . Так, например, при $\Delta_x = 2d_R$ и $d = 2\sigma_x$ $\alpha_{\min} = 0,5 - 0,47725 = 0,02$, и по мере роста сдвига Δ_x эта вероятность будет стремиться к нулю.

В работе [15] и др. рассмотрен случай ложной идентификации нескольких веществ из пробы. Предлагается вероятность ложной идентификации в этом случае вычислять по формуле

$$\alpha = \sum_{i=1}^m \alpha(i), \quad (6.13)$$

где $\alpha(i)$ - вероятность ошибки 1го рода, оцененная для i го вещества в пробе, m - число кандидатов на идентификацию.

Ошибка 2го рода представлена на рис. 6.2.

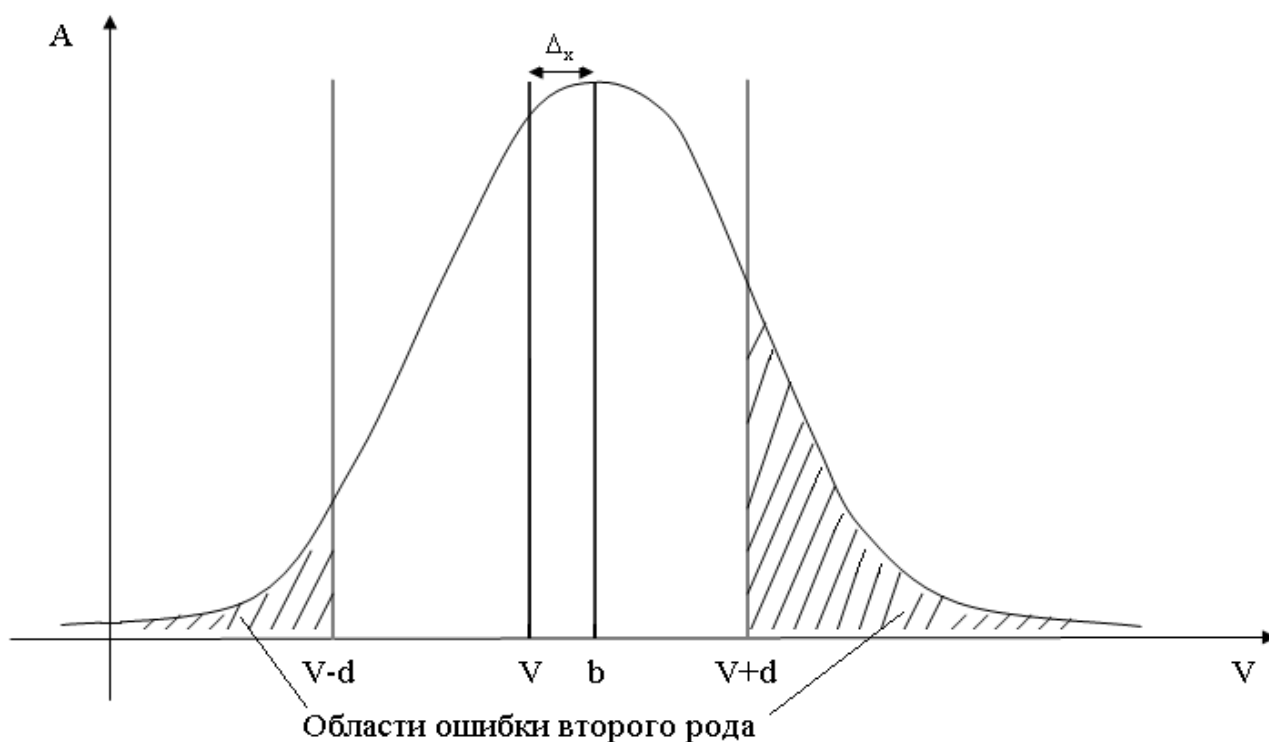


Рисунок 6.2. Ошибка второго рода

Ошибка 2го рода возникает тогда, когда идентифицируемое вещество в пробе присутствует, а измерения его параметров приводят к выводу об его отсутствии. Из определения ошибки 2го рода следует, что ее вероятность необходимо вычислять по формуле

$$\beta = 1 - \left[\Phi\left(\frac{\Delta_x + d_R}{\sigma_x}\right) - \Phi\left(\frac{\Delta_x - d_R}{\sigma_x}\right) \right]. \quad (6.14)$$

при этом минимальная оценка этой вероятности получается при $\Delta_x = 0$. Она имеет вид

$$\beta = 1 - 2\Phi\left(\frac{d_R}{\sigma_x}\right). \quad (6.15)$$

В общем виде приведенные формулы описывают вычисления ошибок первого и второго рода, но для решения нашей конкретной задачи необходимо остановиться на некоторых важных особенностях. Как было показано выше, разработанная тестовая смесь БД-2012 позволяет фиксировать даже незначительные изменения значений параметров хроматографа и тем самым позволяет уменьшать дисперсии определяемых

характеристик, что в свою очередь будет влиять на ошибки первого и второго рода.

Наглядные изображения представлены на следующих рисунках (рис. 6.3, рис.6.4).

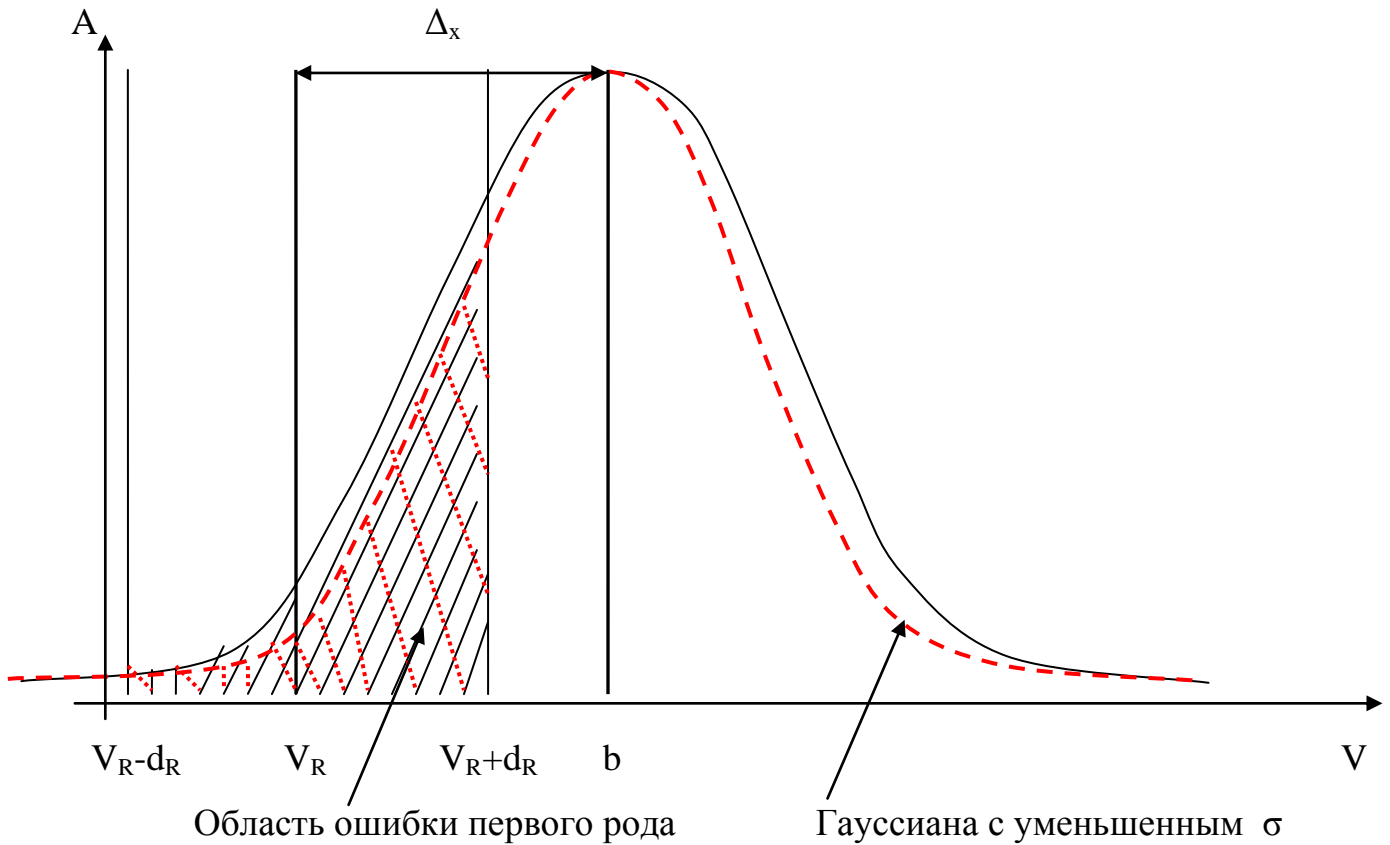


Рисунок 6.3. Ошибка первого рода, получаемая при использовании тестовой смеси БД-2012

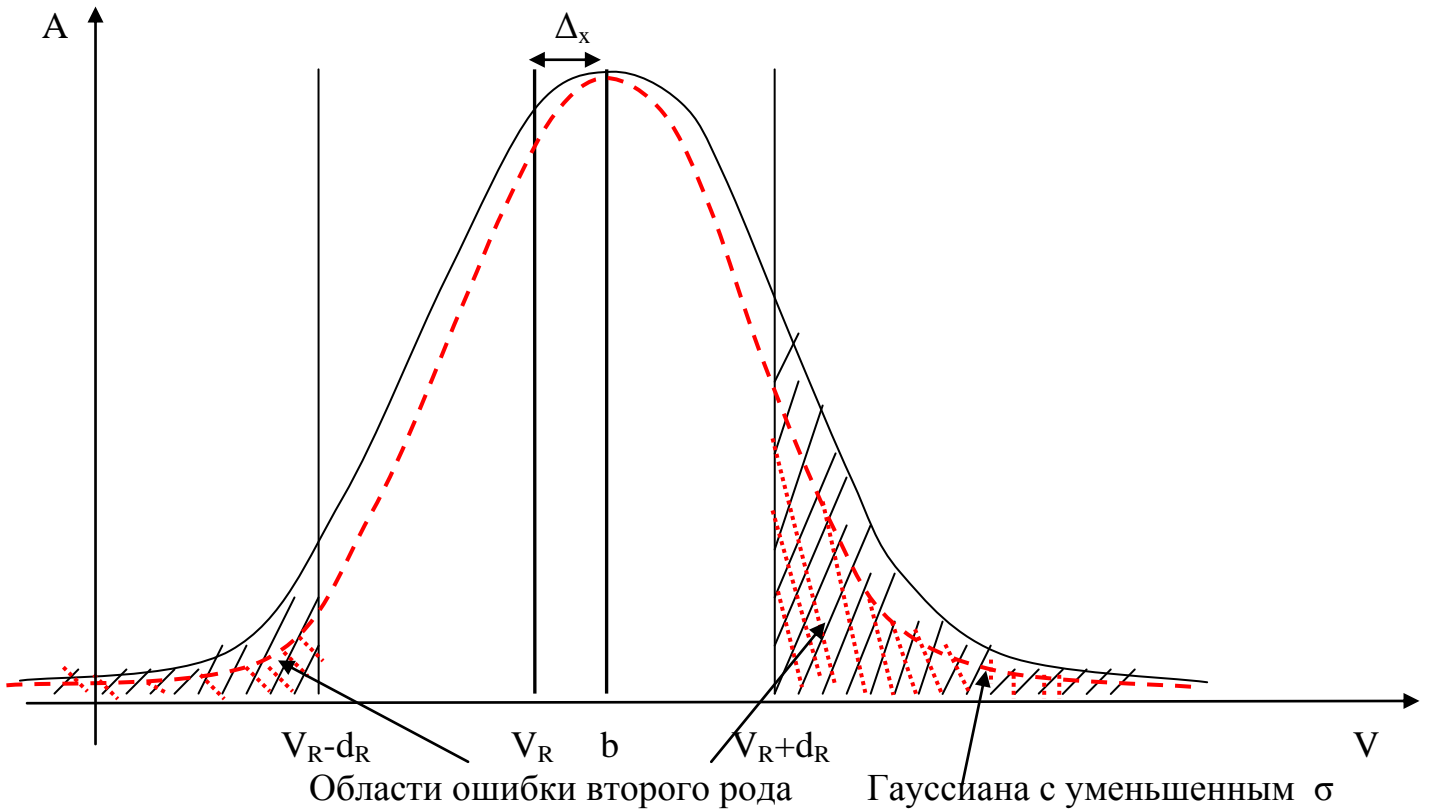


Рисунок 6.4. Ошибка второго рода, получаемая при использовании тестовой смеси БД-2012

Однако, необходимо признать, что при уменьшении дисперсии σ обеспечивается не уменьшение значений ошибок первого и второго рода, а ужесточение (уменьшение) интервала, в который должен будет попасть результат идентификации для того, чтобы считаться достоверным. Таким образом, практического значения использование слишком узкого интервала не имеет.

Рассмотрим случай, когда мера различия больше дисперсии, например

$$\Delta_x = 210 \text{ мкл} \quad d_R = 2\sigma_x \quad \sigma_x \approx 100 \text{ мкл}$$

Тогда получим значение ошибки первого рода:

$$\begin{aligned} \alpha &= \Phi\left(\frac{\Delta_x + d_R}{\sigma_x}\right) - \Phi\left(\frac{\Delta_x - d_R}{\sigma_x}\right) = \Phi\left(\frac{210 + 200}{100}\right) - \Phi\left(\frac{210 - 200}{100}\right) = \Phi(4,1) - \Phi(0,1) = \\ &= 0,49998 - 0,03983 = 0,46 \end{aligned}$$

Теперь, если при этих условиях мы уменьшим (опосредованно за счет применения тестовой смеси) дисперсию, то получим:

$$\alpha = \Phi\left(\frac{\Delta_x + d_R}{\sigma_x}\right) - \Phi\left(\frac{\Delta_x - d_R}{\sigma_x}\right) = \Phi\left(\frac{210+140}{70}\right) - \Phi\left(\frac{210-140}{70}\right) = \Phi(5,0) - \Phi(1,0) = 0,5 - 0,3413 = 0,1587$$

совершенно другое значение ошибки первого рода, которое демонстрирует предложенные выше выводы.

Изложенная методология и формулы достаточны для того, чтобы проводить идентификацию по одной идентификационной характеристике. Если же однозначной идентификации в рассматриваемом случае провести нельзя, то следует привлекать соображения, основанные на рассмотрении дополнительной информации.

6.3 Определение достоверности идентификации по экспериментальным данным

Вопрос о привлечении дополнительных данных для проведения идентификации рассмотрим на конкретном примере, когда идентификация только на основе данных по объему удерживания является неоднозначной.

Например, в эксперименте по измерению объема удерживания было получено значение $V_R(1) = 3109$ мкл, которое по базе данных соответствует (2-Хлорфенил) - дифенилметанолу. При этом по той же базе имеется еще два кандидата на присутствие в анализируемой пробе с близкими объемами удерживания - 1,5-Диметилнафталин ($V_R(2) = 3108$ мкл) и 2,3-Диметилнафталин ($V_R(3) = 3114$ мкл).

Оценим правильность идентификации этих веществ по идеологии, изложенной в предыдущем разделе.

Поскольку в эксперименте был измерен объем удерживания $V_R(1) = 3109$ мкл, то предполагается, что вещество с такой характеристикой в пробе присутствует, а это означает, что актуальной является оценка вероятности ошибки 2го рода (вероятность его необнаружения). Из записи данных в базе следует, что $\sigma \approx 100$ мкл. Если взять допуск в 3σ , т.е. $d = 3\sigma$, то по формуле

$$\beta = 1 - 2 \Phi(d/\sigma) \quad (6.16)$$

получим $\beta = 0,003$, т.е. вероятность получения ложноотрицательного результата в этом случае мала. Такая же вероятность ошибки 2го рода получается и для двух других кандидатов, поскольку отношение $\frac{d}{\sigma}$ зависит только от d , и при фиксированном $d = 3\sigma$ для всех кандидатов, это отношение остается тем же самым для всех кандидатов (поскольку и $\sigma \approx 100$ мкл для всех кандидатов).

Для полноты картины оценим вероятность ошибки 1го рода для (2-Хлорфенил) – дифенилметанола (т.е. вероятность его ложной идентификации). Самая неблагоприятная ситуация будет реализована тогда, когда измеренное значение объема удерживания V_x попадет на границу допуска $V_R + d_R$. Тогда $\Delta_x = d_R$ и формула (7) принимает вид $\alpha = \Phi\left(\frac{d_R}{\sigma_x}\right)$. При

уровне значимости $\alpha = 0,05$ $\frac{d_R}{\sigma_x} = 0,02$. Это означает, что при таком уровне

значимости допуск должен быть равен $d_R = 0,02\sigma_x$, т.е. при 10 – процентной точности измерения объема удерживания допуск на его значения должен составлять всего 6 мкл, что трудно выполнимо. Поскольку вероятность ошибки второго рода уже была оценена, то достоверность идентификации в этом случае $P \approx 0,95$.

Если же следовать рекомендациям [15] и полагать $d_R = 3\sigma$, то вероятность ошибки 1го рода $\alpha = 0,498$. При меньшем допуске $d_R = 2\sigma$ эта вероятность $\alpha = 0,477$. Как отмечалось ранее, эта вероятность будет стремиться к нулю по мере увеличения невязки. Достоверность идентификации в этом случае P изменяется от 0,499 до 0,52 и является невысокой. Таковы же оценки идентификации и для двух других кандидатов.

Приходим к выводу, что в рассматриваемом случае (при рассмотрении в качестве параметра идентификации лишь объема удерживания) однозначная идентификация невозможна.

Для однозначной идентификации в дальнейшем используются данные по измерению 7 спектральных отношений компонентов с использованием 8 длин волн для каждого идентифицируемого вещества. Эти данные имеют вид таблицы 6.2 в общем виде или таблицы 6.3 для реальных веществ.

Таблица 6.2.

Спектральные отношения 2 анализируемых веществ

<i>вещество 1</i>	S_{11}	S_{12}	S_{13}	S_{14}	S_{15}	S_{16}	S_{17}
<i>вещество 2</i>	S_{21}	S_{22}	S_{23}	S_{24}	S_{25}	S_{26}	S_{27}

Таблица 6.3.

Спектральные отношения реальных веществ

Название вещества	V_R , мкл	Спектральные отношения (S_λ/S_{210})						
		$\lambda = 220$	$\lambda = 230$	$\lambda = 240$	$\lambda = 250$	$\lambda = 260$	$\lambda = 280$	$\lambda = 300$
(2-Хлор-фенил)-дифенилметанол	3109	0,56	0,13	0,02	0,01	0,02	0,00	0,00
1,5-Диметилнафталин	3108	2,31	1,93	0,07	0,05	0,11	0,29	0,20
2,3-Диметилнафталин	3114	2,61	1,65	0,09	0,08	0,13	0,17	0,02

На самом деле в этих обстоятельствах решающим является характер экспериментальных данных. Если в эксперименте реализовались спектральные отношения, характерные для первого вещества, то однозначно идентифицируется именно это вещество.

Из приведенной ниже таблицы 6.4 видно, что имеется три вида невязок (вычисленных по формуле (6.2) без учета знака разности) по спектральным отношениям.

Таблица 6.4.

Невязки спектральных отношений

Δ / λ	$\lambda = 220$	$\lambda = 230$	$\lambda = 240$	$\lambda = 250$	$\lambda = 260$	$\lambda = 280$	$\lambda = 300$
Δ_{12}	1,75	1,8	0,05	0,04	0,09	0,29	0,20
Δ_{13}	2,05	1,52	0,07	0,07	0,11	0,17	0,02
Δ_{23}	0,3	0,28	0,02	0,03	0,02	0,12	0,18

Для того чтобы вычислить вероятность присутствия вещества в пробе по спектральным отношениям, необходимо снова определиться с критерием идентификации. На самом деле - это прежний критерий, описываемый формулой (5.3). Однако допуск на значения спектральных отношений будет другой, определяемый СКО измерений этой величины.

Из табличных значений видно, что спектральные отношения определялись с точностью до 0,03, поэтому примем допущение, что СКО σ_s для всех спектральных отношений s одинаковы и равны 0,03. Если исходить из критерия 3σ , то аргумент функции Лапласа, определяющей значение ошибки 2го рода (пропуск идентификации), равен $\frac{d_R}{\sigma(i)} = 0,49865$, а сама вероятность $\beta = 0,003$. Поскольку эта вероятность не зависит от значений невязок, то вероятность пропуска идентификации для всех рассматриваемых веществ одинакова и мала.

При определении вероятности ошибок 1 го рода (ложная идентификация) необходимо проанализировать приведенную выше таблицу на предмет удовлетворения невязок критерию (6.3). Если ограничиться допуском $d = 3\sigma = 0,09$, то критерию идентификации удовлетворяют только 4 значения невязки. Это означает, что вероятность ложной идентификации для

всех упомянутых веществ велика. Следовательно, необходимо применять другой критерий для определения статистических оценок спектральных отношений.

6.4 Применение критерия Стьюдента к определению статистических оценок интегральной характеристики набора спектральных отношений

Рассмотрим случай, когда идентификация проводится по времени (объему) удерживания и 7 спектральным отношениям, но для определения статистических оценок спектральных отношений применим критерий Стьюдента.

Мы можем применять методы математической статистики к разности соответствующих спектральных отношений на одной и той же длине волны у двух различных веществ, так как, было указано выше, они являются случайными величинами.

Критерий Стьюдента используют для проверки гипотез, касающихся неизвестного среднего статистической выборки из нормального распределения.

Переформулируем задачу идентификации для включения в нее набора спектральных отношений. Необходимо отметить, что идентификацию следует проводить не для каждого спектрального отношения, а для некоторой интегральной характеристики набора спектральных отношений, как это делается, например, при оценке близости спектров в спектральном анализе [42]. В качестве такой интегральной характеристики предлагается рассматривать среднее значение спектральных отношений \bar{s} конкретного вещества. Заметим, что это среднее значение не является математическим ожиданием, поскольку набор спектральных отношений для каждого вещества не является случайным. Таким образом, среднее значение спектральных

отношений \bar{s} вещества является просто средним арифметическим набора значений спектральных отношений.

При решении проблемы идентификации, как и в предыдущем случае, необходимо иметь дело как с базовым набором спектральных отношений, которому будем присваивать индекс 0, так и с экспериментально измеренными наборами (индекс i). Далее, необходимо ввести в рассмотрение разности (невязки $\Delta(0, i, j)$) между базовыми и измеренными значениями спектральных отношений, т.е. для j го вещества вводится следующий набор невязок

$$\Delta(0, i, j) = s(0, i) - s(i, j). \quad (6.17)$$

Этот набор невязок уже будет случайным, и, как всякая случайная величина, характеризуется математическим ожиданием, оцениваемым как среднее арифметическое, и СКО. Поскольку объем выборки N невелик ($N=7$), предполагается, что набор невязок описывается распределением Стьюдента. Введем в рассмотрение среднее значение невязок для j го вещества

$$\Delta_{cp}(0, j) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \Delta(0, i, j), \quad (6.18)$$

где N - число спектральных отношений.

Для согласования вычисленных средних значений невязок со значениями, полученными из данных по средним значениям спектральных отношений, при вычислении средних значений невязок следует брать их алгебраическую сумму.

Из (6.17) следует, что

$$\Delta_{cp}(0, j) = \bar{s}(0) - \bar{s}(j), \quad (6.19)$$

где средние значения наборов спектральных отношений определяются соотношениями

$$\bar{s}(0) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N s(0, i), \quad \bar{s}(j) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N s(i, j).$$

Вещество считается идентифицированным, если выполняется условие

$$\Delta_{cp}(0, j) < d, \quad (6.20)$$

или,

$$\bar{s}(0) - \bar{s}(j) < d, \quad (6.21)$$

где d - допуск на среднее значение базовых спектральных отношений:
 $\bar{s}(0) - d < \bar{s}(0) < \bar{s}(0) + d$.

Если сами базовые спектральные отношения определяли в результате многократных измерений, то допуск на каждое значение спектрального отношения записывается в виде $d(i) = l \cdot \sigma(0)$, где $\sigma(0)$ - среднее квадратическое отклонение, $l = 2$ или 3). Допуск на среднее значение спектральных отношений записывают в виде $d = l \cdot \sigma(0) / \sqrt{N}$. Таким образом, условие идентификации по спектральным отношениям принимает вид

$$\Delta_{cp}(0, j) < d = \frac{l \cdot \sigma(0)}{\sqrt{N}}. \quad (6.22)$$

Гипотеза H_0 (нулевая гипотеза) заключается в утверждении, что рассматриваемое вещество в пробе отсутствует. Это означает, что в этом случае должно выполняться неравенство

$$\Delta_{cp}(0, j) - d > 0. \quad (6.23)$$

Гипотеза H_1 (альтернативная гипотеза) предполагает наличие вещества в пробе. Условие присутствия вещества выражается неравенством

$$\Delta_{cp}(0, j) - d < 0. \quad (6.24)$$

Для выяснения вопроса о том, какая из двух гипотез реализуется, предлагается использовать критерий Стьюдента.

Квантиль распределения Стьюдента $t_{N-1, P}$, отвечающий вероятности $P = 0,95$ и числу степеней свободы $N - 1 = 6$ ($N = 7$) равен 2,4470. Это означает, что именно такое значение переменной $\Delta_{cp}(0, j) - d$ реализуется с вероятностью $P = 0,95$. Обратим внимание на то, что, если гипотеза H_0 верна, то переменная $\Delta_{cp}(0, j) - d$ принимает положительные значения, при

гипотезе H_1 эта переменная отрицательна. Знак этой переменной определяет и знак коэффициентов Стьюдента

$$t(0, j) = \frac{\sqrt{N} \cdot (\Delta_{cp}(0, j) - d)}{S(0, j)}, \quad (6.25)$$

где S вычисляют по формуле

$$S^2(0, j) = \frac{1}{(N-1)} \sum_{i=1}^N (\Delta(0, i, j) - \Delta_{cp}(0, j))^2. \quad (6.26)$$

Таблицы отрицательных коэффициентов Стьюдента отсутствуют, поскольку такие коэффициенты могут быть получены из положительных коэффициентов с использованием следующего свойства симметрии

$$t_{\alpha}(0, j) = -t_{1-\alpha}(0, j). \quad (6.27)$$

Если вычисленное по экспериментальным данным значение квантиля $t(0, j)$ оказывается меньше табличного $t_{N-1, P}$, т.е. выполняется условие

$$t(0, j) < t_{N-1, P}, \quad (6.28)$$

то соответствующая гипотеза отвергается, альтернативная – принимается.

Применение критерия Стьюдента поясним на следующем примере.

С этой целью приведем данные по спектральным отношениям для 3 известных и одного неизвестного вещества.

Пирен: $V_R(1,1) = 3301$ мкл, 1,15 3,55 5,77 1,08 1,88 0,40 0,59 $\bar{s}(0) = 2,06$

Вещество 1 (неизвестное анализируемое вещество):

$V(1,1) = 3302$ мкл, 1,12 3,22 6,00 0,98 1,86 0,50 0,53 $\bar{s}(1) = 2,03$

Вещество 2 (ионол):

$V(2,1) = 3569$ мкл, 0,54 0,33 0,06 0,01 0,04 0,15 0,00 $\bar{s}(2) = 0,16$

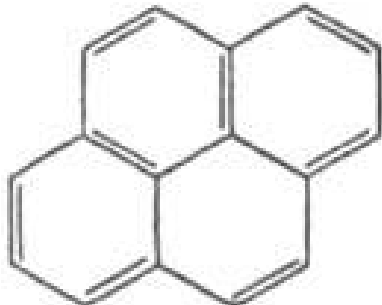
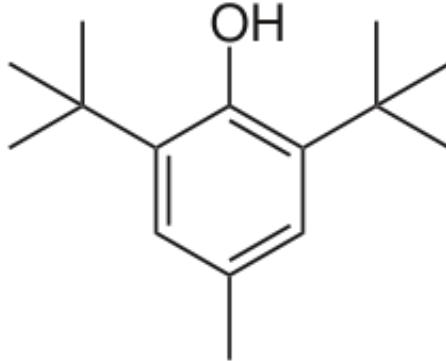
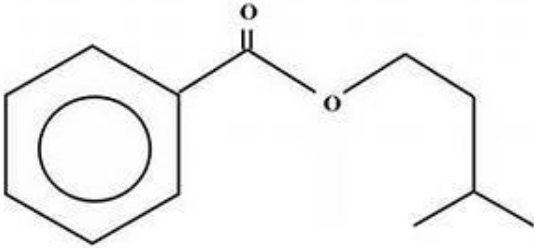
Вещество 3 (изоамилбензоат):

$V(3,1) = 3304$ мкл. 2,15 3,15 1,58 0,27 0,17 0,17 0,00 $\bar{s}(3) = 1,07$

Здесь 7 колонок цифр означают спектральные отношения, полученные для анализируемых веществ на восьми длинах волн, правая колонка относится к средним значениям спектральных отношений.

Наименования и формулы указанных веществ приведены в таблице 6.5.

Наименования и формулы анализируемых веществ

Наименование вещества	Формула	Пространственная формула
Пирен	$C_{16}H_{10}$	
систематическое наименование – пирен		
Ионол	$(CH_3)(tert-C_4H_9)_2C_6H_2OH$	
систематическое наименование – 2,6-ди-трет-бутил-4-метил-фенол, 2,6-ди-трет-бутил-п-крезол		
Изоамилбензоат	$C_6H_5COOCH_2CH_2CH_2CH(CH_3)_2$	
систематическое наименование – изоамиловый эфир бензойной кислоты		

На основании приведенных данных можно по формуле (6.19) вычислить невязки средних значений (с учетом знака разности) спектральных отношений анализируемых веществ по отношению к базовым спектральным отношениям для пирена (табл. 6.6).

Таблица 6.6.

Невязки средних значений спектральных отношений анализируемых веществ по отношению к пирену

Δ / λ	$\lambda = 220$	$\lambda = 230$	$\lambda = 240$	$\lambda = 250$	$\lambda = 260$	$\lambda = 280$	$\lambda = 300$	$\Delta_{cp}(0, j)$
Δ_{01}	0,03	0,33	- 0.23	0,10	0,02	- 0,10	0,06	0,03
Δ_{02}	0,61	3,22	5,71	1,07	1,84	0,25	0,59	1,90
Δ_{03}	- 1,00	0,40	4,19	0,81	1,71	0,23	0,59	0,99

После этого по формуле (6.26) вычисляют СКО невязок для анализируемых веществ.

$$\delta^2_1(0,1) = 0,0000, \delta^2_2(0,1) = 0,09, \delta^2_3(0,1) = 0,0676, \delta^2_4(0,1) = 0,9409, \\ \delta^2_5(0,1) = 0,0001, \delta^2_6(0,1) = 0,0169, \delta^2_7(0,1) = 0,0300. \underline{S(0,1) = 0,4369}$$

$$\delta^2_1(0,2) = 1,6641, \delta^2_2(0,2) = 1,7424, \delta^2_3(0,2) = 14,5161, \delta^2_4(0,2) = 0,6889, \\ \delta^2_5(0,2) = 0,0036, \delta^2_6(0,2) = 2,7225, \delta^2_7(0,2) = 1,7161. \underline{S(0,2) = 1,9610}$$

$$\delta^2_1(0,3) = 3,9600, \delta^2_2(0,3) = 0,3481, \delta^2_3(0,3) = 10,2400, \delta^2_4(0,3) = 0,0324, \\ \delta^2_5(0,3) = 0,5184, \delta^2_6(0,3) = 0,5776, \delta^2_7(0,3) = 0,1600. \underline{S(0,3) = 3,9795}$$

По формуле (6.25) вычисляют значения соответствующих коэффициентов Стьюдента.

Допуск на значения спектральных отношений базового вещества выбирают равным $2\sigma(0) = 0,02$. Поскольку теперь сравнение идет по средним значениям спектральных отношений и невязок, то удвоенное значение СКО, определяющее допуск, будет равно

$$\frac{2\sigma(0)}{\sqrt{N=7}} = d = 0,0075$$

В предположении, что реализуется гипотеза H_0 (вещество в пробе отсутствует, и переменная $\Delta_{cp}(0, j) - d$ положительна), для коэффициентов Стьюдента получаем

$$t_0(0,1) = 1,9875,$$

$$t_0(0,2) = 2,6395,$$

$$t_0(0,3) = 2,6292.$$

Напомним, что табличное значение $t_{p=0,95} = 2,4470$.

Сравнивая вычисленные значения коэффициентов Стьюдента с табличными (см. условие (6.28)), приходим к выводу, что для веществ 2 и 3 гипотеза H_0 справедлива (эти вещества в пробе отсутствуют), а для вещества 1 эта гипотеза должна быть отвергнута, т.е. оно может быть идентифицировано как пирен. При этом уровень значимости α (значение ошибки 1го рода, т.е. вероятность ложной идентификации) оказывается равным 0,05, а соответствующая вероятность идентификации $p = 0,95$.

Аналогичный результат получается и при анализе пробы в рамках гипотезы H_1 . В рассматриваемом случае переменная $\Delta_{cp}(0, j) - d < 0$, и соответствующие коэффициенты Стьюдента тоже отрицательны. Табличное значение, отвечающее уровню значимости 0,05, с учетом свойства симметрии коэффициентов Стьюдента (6.27) также отрицательно, т.е. $t_{p=0,05} = -2,4470$. Сравнивая вычисленные значения коэффициентов Стьюдента с табличным, получаем, что $t_1(0,1) = -1,9875 > t_{p=0,05} = -2,4470$, т.е. вещество 1 удовлетворяет условиям гипотезы H_1 . Таким образом, первое вещество может и в этом случае идентифицироваться как пирен. Для остальных двух веществ гипотеза H_1 должна быть отвергнута, т.е. с вероятностью 0,95 их нельзя отождествлять с пиреном.

Глава 7

Процедура корректировки базы данных

В данной главе приводится процедура корректировки базы данных.

Процедура позволяет учитывать небольшие флуктуации значений параметров хроматографа, которые возникают вследствие старения колонки, и как следствие, вызывают изменение свободного объема колонки; старения лампы – источника УФ излучения, и связанный с ней сдвиг настройки длин волн монохроматора и т.п. явления. Процедура дает возможность использовать для целей идентификации и количественного определения пригодный хроматограф с несколько изменившимися параметрами без дорогостоящей замены основных узлов. Процедура позволяет корректно сравнивать результаты, полученные на различных приборах одного типа, и переносить БД на эти приборы без потери достоверности идентификации.

Параметр, изменения которого необходимо учитывать, свободный объем колонки, который может измениться вследствие старения колонки.

Количественные зависимости между структурой молекулы и ее удерживанием, учитывающие электронное строение молекулы, геометрию, вращение фрагментов представлены в [93, 94].

Сложность применения указанных подходов заключается в оценке вклада в удерживание того или иного взаимодействия молекулы аналита с хроматографической системой. В соответствии с [90] удерживание в обращено фазовой ВЭЖХ рассматривается как результат электростатических взаимодействий и обмена электронами и протонами между молекулами анализируемого вещества и неподвижной фазой. Такой подход дает качественное представление процесса удерживания [92], но не может использоваться для расчета в связи с многочисленными упрощениями и неопределенностями.

Сложность применения указанных подходов заключается в сложности измерения вклада в удерживание того или иного взаимодействия молекулы analyта с хроматографической системой [92]. Как следует из литературных источников [95-97] основной параметр вещества, характеризующий удерживание, коэффициент емкости зависит от концентрации сильного компонента подвижной фазы –

$$\log k' \approx \log k'_0 - nc \text{ или } k' \approx k'_0 \cdot 10^{-nc}, \quad (7.1)$$

где c – концентрация сильного компонента подвижной фазы,

k'_0 – коэффициент емкости анализируемого вещества в отсутствие сильного компонента подвижной фазы,

nc – количество атомов углерода в соединении.

Для определения k'_0 проводят экспериментальные исследования, а именно – хроматографический анализ вещества с различными значениями концентрации органического растворителя в подвижной фазе в изократическом режиме. Затем строят график зависимости $\log k'$ от концентрации сильного компонента и из графика находят k'_0 .

При подстановке полученных значений констант в формулу, определяющую объем удерживания $V_R = k' \cdot V_0 + V_0$, получаем:

$$V_R = V_0 \cdot (k'_0 \cdot 10^{-nc} + 1) \quad (7.2)$$

Таким образом, многочисленные исследования [90, 93 - 97] дают основания утверждать, что внесение изменившегося значения свободного объема не дает возможности скорректировать объемы удерживания всех веществ, содержащихся в базе данных. Это связано с тем, что каждое вещество будет выходить из колонки со временем удерживания, отличным от указанного в базе данных, и зависеть это изменение будет не только от значения свободного объема, но и от природы взаимодействия analyта с сильным компонентом подвижной фазы. Для каждого вещества изменение удерживания будет носить сугубо индивидуальный характер, зачастую не поддающийся более или менее точному прогнозу. Поэтому корректировка

БД при старении колонки возможна, но требует проведения дополнительных исследований по определению k'_0 для каждого вещества, входящего в БД.

Таким образом, для учета флуктуаций свободного объема необходимо проведение повторного анализа всех интересующих аналитика веществ из БД для определения значения сдвига по сравнению с прежними значениями параметра.

К параметрам хроматографов, изменения которых можно учесть более простым способом относится длина оптического пути измерительной ячейки детектора. База данных составлена на основе измерений с использованием детекторов с длиной ячейки 1,56 мм, и строго говоря, корректно может использоваться с хроматографами, укомплектованными ячейками, имеющими такой же размер. В действительности от детектора к детектору это значение может меняться от 1,54 до 1,58. Возможность учета отклонения этого значения позволит применять уже имеющуюся базу данных для хроматографов с измененной длиной ячейки.

Согласно закону Бугера-Ламберта-Бера оптическая плотность поглощающего вещества прямо пропорциональна длине оптического пути, концентрации вещества и его экстинкции:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l \quad (7.3)$$

На хроматограмме значению оптической плотности соответствует высота хроматографического пика. Появляется возможность учесть изменившееся значение длины оптического пути и пересчитать объем удерживания веществ всей БД.

Таким образом, мы можем применять для целей идентификации хроматограф со значениями параметров, отличных от того, на котором была создана БД. Если значения спектральных отношений тестового вещества будут выходить за нормированные пределы, процедура позволит учесть это изменение, и скорректированную БД можно будет использовать для идентификации и количественного определения анализируемого вещества.

Применение данной процедуры дает возможность переноса БД на приборы одного типа без потери достоверности идентификации.

С этой целью используем уже известный пример с 3 известными веществами – пиреном, ионолом, изоамилбензоатом и одним неизвестным веществом.

Предполагаем, что реализуется гипотеза H_0 (вещество в пробе отсутствует). Для коэффициентов Стьюдента для длины оптического пути $l_1 = 1,56$ мм и измененной длиной $l_2 = 1,55$ мм, и проведенной коррекцией получаем значения, приведенные в таблице 7.1.

Таблица 7.1.

Значения коэффициента Стьюдента, рассчитанные для детекторов с различными длинами оптического пути при применении процедуры коррекции

Значения коэффициента Стьюдента	При $l_1 = 1,56$	При $l_2 = 1,55$
$t_0(0,1)$	1,9875	1,9521
$t_0(0,2)$	2,6395	2,6485
$t_0(0,3)$	2,6292	2,5952

Табличное значение $t_{P=0,95} = 2,4470$.

Сравнивая значения коэффициентов Стьюдента, приведенные в таблице 7.1. с табличными (см. условие (6.28)), получаем, что для веществ 2 и 3 гипотеза H_0 справедлива (эти вещества в пробе отсутствуют) в случае применения детектора с длиной оптического пути 1,56 мм, и для детектора с длиной оптического пути 1,55 мм.

Для вещества 1 эта гипотеза должна быть отвергнута, т.е. оно может быть идентифицировано как пирен в случаях применения обоих длин оптического пути. При этом уровень значимости α (значение ошибки 1го

рода, т.е. вероятность ложной идентификации) оказывается равным 0,05, а соответствующая вероятность идентификации $P = 0,95$.

Таким образом, получаем, что процедура коррекции позволяет переносить БД на приборы одного типа без потери достоверности идентификации.

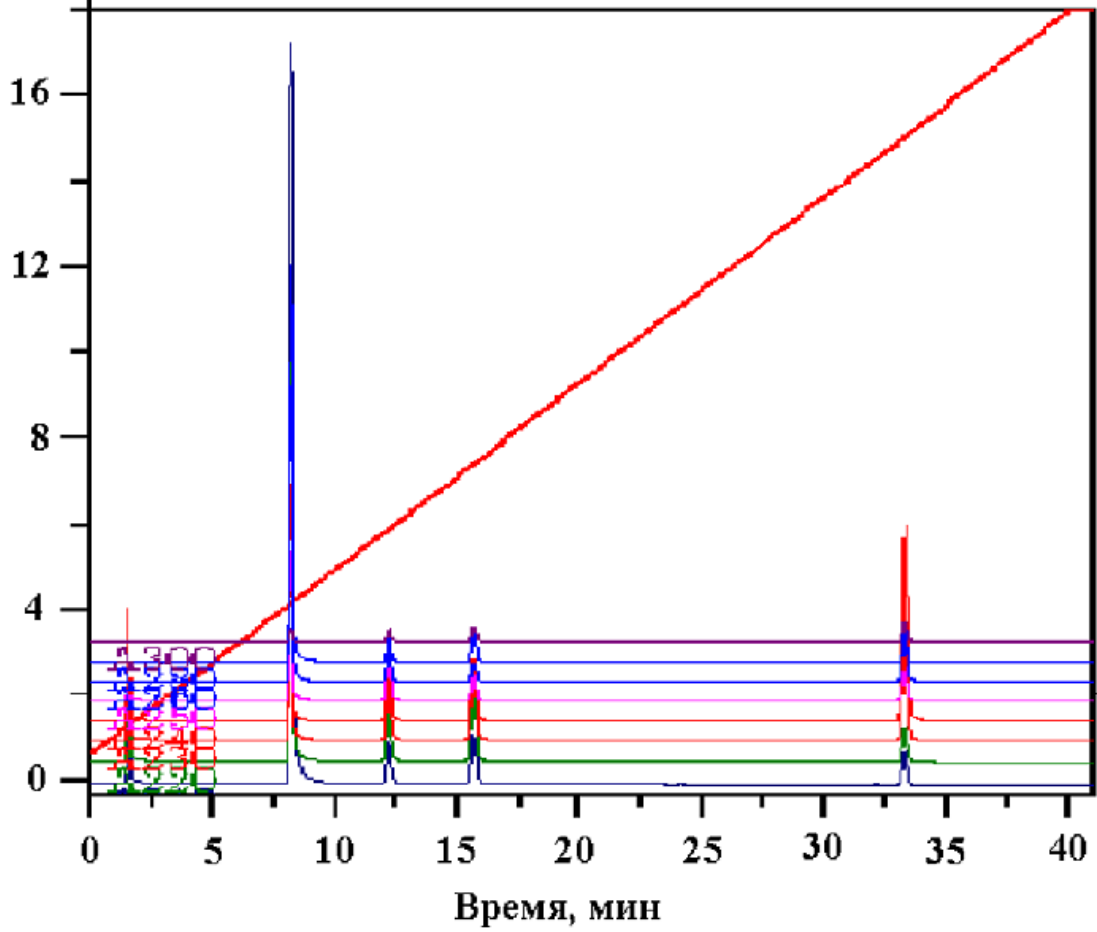
Пример отчета анализа, выдаваемый жидкостным хроматографом Милихром А-02, приведен на следующем рисунке (рис. 7.1).

Report date:	08.04.2013 12:41:16	
Printed by:	Kulyabina E.V.	
Ident:	БД- 2012	
Analysis from:	06.06.2012 23:45:12	
File:	23450090.CHW	Last save: 0:00:00
Method:	db_2012.mtw	Last save: 17.11.2011 11:04:34
Analysis number:	0	
SAMPLE:	Смесь БД-2012 от 1.06.12 прибор N297	
Vial number:	6	
Volume:	2.0 µl	
Dilution:	1.00	
COLUMN:	ProntoSIL 120-5-C18 БД-2003	
Size:	2.0 x 75 mm	
Number:	3370	
Part.size:	5.0 µm	
ELUENT:	[4M LiClO ₄ - 0.1M HClO ₄]: H ₂ O Ацетонитрил	
Comments		
Flow:	100.00 мкл/мин	

Temperature: 40.0°C

Pressure: 2.1 MPa

A, е.о.п.



Quantitation method: Custom

No	Retention мкл	Width/2 мкл	Height AU	Area AU*мкл	Resolution n,n+1	Asym.
1	153.77	9.508	1.19	12.950	27.22	1.44
2	819.07	19.337	17.99	374.927	11.14	2.05
3	1222.19	23.378	0.89	21.705	9.13	1.16
4	1566.44	21.137	1.09	25.009	46.60	1.10
5	3335.97	23.671	0.74	19.916	0.00	1.14
5	4297.42	19.406	21.91	454.507		1.38

No	Retention мкл	220nm	230nm	240nm	250nm	260nm	280nm	300nm	Name
1	153.77	1.873	2.336	1.006	0.199	0.033	0.006	0.001	
2	819.07	0.536	0.316	0.189	0.190	0.373	0.477	0.013	
3	1222.19	1.348	1.563	1.445	1.231	0.904	0.550	0.285	
4	1566.44	1.692	1.764	1.096	0.580	0.401	0.598	0.296	
5	3335.97	1.124	3.505	5.907	1.021	1.851	0.358	0.599	
<hr/>									
5	4297.42								
<p>This report has been created by МультиХром-СПЕКТР для Windows Ampersand Ltd.</p>									

Рисунок 7.1. Отчет анализа тестовой смеси БД-2012

Заключение

Основные выводы и результаты работы.

1. В результате проведенных исследований выбраны параметры хроматографа, контроль которых обеспечивает достоверность идентификации и количественного определения органических соединений:

- свободный объем и качество упаковки колонки;
- точное дозирование образца инжектором;
- настройка длин волн монохроматора УФ детектора;
- линейность детектора;
- бесперебойная работа насосов;
- состав подвижной фазы;
- бесперебойная работа смесителя.

2. Выбраны вещества, позволяющие наиболее эффективно контролировать конкретные параметры хроматографа: йодид калия, пирен, орто-Нитроанилин, мета-Нитроанилин, кофеин.

3. Разработана тестовая смесь на основе веществ-маркеров с унифицированными характеристиками для контроля изменений параметров хроматографа.

4. Разработана методика идентификации и количественного определения содержания органических веществ без применения традиционной градуировки. Методика включает в себя проведение контроля параметров хроматографа по тестовой смеси с последующим анализом вещества, его идентификацией по БД-2012 и количественным определением его содержания.

5. Для достоверной идентификации веществ в рамках БД-2012 достаточно иметь значения объема удерживания анализируемого вещества и его спектральные отношения или их интегральную характеристику.

6. Разработанная процедура введения поправок в БД-2012 позволяет учитывать изменения параметров хроматографа во времени (сдвиг настройки

длины волны монохроматора) и переносить базу данных на другие приборы без потери достоверности идентификации.

Основные материалы диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Г.И.Барам, И.Н.Азарова, ЗАО Эконова, Новосибирск, Е.В.Кулябина, О.Л.Рутенберг, ФГУП "ВНИИМС", Москва, Метрологическое обеспечение баз данных. Исследование и выбор веществ-маркеров для контроля мертвого объема хроматографической колонки. Материалы III Международной научно-практической конференции "Обеспечение единства измерений физико-химических и оптико-физических величин" г. Киев, 2008.
2. Г.И.Барам, И.Н.Азарова, Л.А. Кожанова, ЗАО Эконова, Новосибирск, Е.В.Кулябина, О.Л.Рутенберг, ФГУП "ВНИИМС", Москва, Метрологическое обеспечение баз данных. Исследование и выбор веществ-маркеров для контроля погрешности установки длины волны спектрофотометрического детектора УФ-диапазона хроматографической системы. Материалы Международной научно-практической конференции "Метрология-2009", г. Минск, 2009.
3. Г.И.Барам, И.Н.Азарова, ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск, Е.В.Кулябина, О.Л.Рутенберг, ФГУП "Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы", г. Москва, Метрологическое обеспечение баз данных ВЭЖХ-УФ. Исследование и выбор веществ-маркеров для контроля свободного объема хроматографической колонки, "Заводская лаборатория", № 2, 2010 г. (том 76), С. 66-70.
4. Г.И.Барам, И.Н.Азарова, Е.В.Кулябина, О.Л.Рутенберг, Разработка методов исследования комплекса веществ с унифицированными

хроматографическими характеристиками и создание базы данных, необходимых для идентификации сложных органических веществ. Исследование и выбор веществ-маркеров для контроля значения рН элюента. //Законодательная и прикладная метрология.- 2010.- № 1 (107). С. 13-17.

5. Ю.А. Кудеяров, Е.В. Кулябина, О.Л. Рутенберг, Применение критерия Стьюдента для определения достоверности идентификации веществ при хроматографическом анализе. //Законодательная и прикладная метрология.- 2013.- № 3. С. 44-48.

6. Е.В. Кулябина. Тестовая смесь, как средство метрологического обеспечения высокоэффективных жидкостных хроматографов. //Приборы.- 2013.- № 10. С. 52-54.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cazes J. (Editor). Encyclopedia of Chromatography. Marcel Dekker, Inc., 2004. - pp.1679.
2. Miller J.M. Chromatography. Concepts and contrasts. 2nd Edition. Wiley Interscience. 2005, - pp.518.
3. Руденко Б.А. (Редактор). 100 лет хроматографии. - М.: Наука, 2003. - 744 с.
4. Стыскин Е. Л., Ициксон Л. Б., Брауде Е. В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. - М. 1986. - С. 5-7.
5. Dieter Maier and Maciej Bogusz. Identification Power of a Standardized HPLC-DAD System for Systematic Toxicological Analysis. //Journal of Analytical Toxicology. 1995. -V. 19. - pp.79-83.
6. Herzler M., Pragst F., Herre S., Rothe M. Selectivity of Photodiode Array UV Spectra for Substance Identification in Systematic Toxicological analysis.// Problems of Forensic Sciences. 2000.- Vol. XLII. - pp. 122–129
7. Herzler M., Herre S., Pragst F. Selectivity of Substance Identification by HPLC–DAD in Toxicological Analysis using a UV Spectra Library of 2682 Compounds.// J.Analyt. Toxicology. 2003.- Vol. 27. –p p. 233-242.
8. Ronald E. Majors. Column Pressure Considerations in Analytical HPLC. [Электронный ресурс]LC-GC North America,chromatographyonline.com. 2008
9. Saeks J. Liquid Chromatography. A Kalorama Information Market Intelligence Report. //Kalorama Information. 2009. - pp. 187.
10. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3rd Edition. Wiley Inc., 2010. - pp. 957.(p.507)
11. Michael E. Swartz. UPLC™: An Introduction and Review. //J. of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2005. -Vol. 28. - pp.1253–1263
12. Dawson M. Effective UPLC Implementation. American Laboratory. 2011.

- April. - pp. 46-49.
13. Colon L.A., Cintrón J.M., Anspach J.A., Fermier A.M, Swinney K.A. Very high pressure HPLC with 1 mm id columns. *Analyst*. 2004. -Vol. 129, - pp. 503-504.
 14. Jercovich A.D., Mellors J.S., Jorgenson J.W. The Use of Micrometer-Sized Particles in Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography. *LC-GC North America*, 2003.- Vol. 21. No. 7. - pp. 600-610.
 15. Вершинин В.И. Методология компьютерной идентификации веществ с применением информационно-поисковых систем. //Журнал аналитической химии. 2000. -Том 55, № 5.- С. 468-476.
 16. P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux. Ion-pair chromatography on a porous graphitic carbon stationary phase for the analysis of twenty underivatized protein amino acids. //J. Chromatography. A. 2000. -Vol. 870. - pp. 245-254.
 17. Koves E.M. Use of HPLC-DAD in Forensic Toxicology. //J. Chromatography A. 1995. -Vol. 692. - pp. 103-119.
 18. Lambert W.E., Van Bocxlaer J.F., De Leenheer A.P. Potential of HPLC-DAD in Forensic Toxicology.//J. Chromatogr. B. 1997.-Vol. 689, -pp.45-53.
 19. Poletini A. Systematic toxicological analysis of drugs and poisons in biosamples by hyphenated chromatographic and spectroscopic techniques. //J. Chromatogr. B. 1999. -Vol. 733. - pp. 47-63.
 20. Pragst F., Herzler M., Erxleben B-T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). //Clin. Chem. Lab. Med. 2004. -Vol. 42, No.11. - pp. 1325-1340.
 21. British Pharmacopoeia 2009. -Vol. I & II, Monograph: Ampicillin.
 22. Азарова И.Н., Барсегян С.С., Барам Г.И. Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии: Базы данных "ВЭЖХ-УФ". Сборник "Хроматография на благо России. Под ред.

- Курганова А.А. М.: Граница. 2007. - С. 653-665.
23. Willy E. Lambert et al. Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology. //Journal of Chromatography B. 1997. -Vol. 689. - pp. 45-53.
 24. Gaillard Y., Pepin G. Use of HPLC with Photodiodearray UV Detection for the Creation of a 600 Compound Library. Application to Forensic Toxicology. //J. Chromatogr. A. 1997. -Vol. 763. - pp. 149-163.
 25. Schoenberg L., Grobosch T., Lampe D., Kloft C. Analysis of basic compounds in urine by on-line extraction-HPLC-DAD. //Toxichem Krimtech. 2007. -Vol. 74, No. 1. - pp. 64-68.
 26. Schonberg L. Development of a Screening System for the Determination of Compounds in Urine by Automated On-line Extraction HPLC-DAD for Toxicological Analysis. Dissertation. 2008 [Электронный ресурс] (<http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/08/08H303/prom.pdf>).
 27. Рутенберг О.Л., Фаткудинова Ш.Р., Барам Г.И., Азарова И.Н. О метрологическом обеспечении баз данных для идентификации и количественного определения УФ-поглощающих веществ методом ВЭЖХ. //Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2006. -Том 72, № 6. - С. 59-64.
 28. S.P. Elliott and K.A. Hale. Applications of an HPLC-DAD drugscreening system based on retention indices and UV spectra. //J. Anal. Toxicol. 1998. -No 22, - pp. 279–289
 29. Bogusz M., Wu M. Standartized HPLC/DAD System, Based on Retention Indices and Library, Applicable for Systematic Toxicological Screening. //J. Analyt. Toxicology. 1991. -Vol.15. - pp. 188-197.
 30. Elliot S.P., Hale K.A. Development of a high-performance liquid chromatography retention index scale for toxicological drug screening. //J. Chromatogr. B. 1997. -Vol. 694. - pp. 99-114.

31. Elliot S.P., Hale K.A. Applications of an HPLC-DAD Drug-Screening System Based on Retention Indexes and UV Spectra. //J. Analyt. Toxicology. 1998. -Vol. 22. - pp. 279-289.
32. A. Bakdash, M. Herzler, S. Heere, B.-T. Erxlebenm, M. Rothe and F. Pragst. The HPLC-DAD UV spectra of pharmaceuticals and toxic compounds //UV Spectra of Toxic compounds book. 2007
33. Kristian Fog Nielsen, Jørn Smedsgaard, Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology, //Journal of Chromatography A. 2003. -№ 1002. - pp. 111-136.
34. John K. Baker, Ronald E. Skelton and Cheng-Yu Ma. Identification of drugs by high-pressure liquid chromatography with dual wavelength ultraviolet detection. //Journal of Chromatography 1979. -Vol. 168, Issue 2. - pp. 417-427.
35. Kiyokatsu Jinno, Makiko Hayashida and Tokinori Watanabe. Computer-Assisted Liquid Chromatography for Automated Qualitative and Quantitative Analysis of Toxic Drugs. //Journal of Chromatographic Science. 1990. -Vol. 28. - pp.367-373.
36. Patricia R. Puopolo, Mary Ellen Pothier, Sheila A. Volpicelli, and James G. Flood. Single Procedure for Detection, Confirmation, and Quantification of Benzodiazepines in Serum by Liquid Chromatography with Photodiode-Array Detection. Clinical Chemistry, 1991. -Vol. 37, No. 5. - pp. 701-706.
37. И.Г.Зенкевич, С.П.Казанков, К.С.Кузьминых. Органический синтез и технология органических производств. Аналитические параметры природных и синтетических наркотических веществ в обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. //Журнал прикладной химии. 1996. - Т . 69 , Вып. 10. - С. 1712-1716.
38. Liu S.Y., Soo-On Woo S.O., Koh H.L. HPLC and GC–MS screening of

- Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances.
//J. Pharm. Biomed. Analysis. 2001. -Vol. 24. -pp. 983–992.
39. Dwight R. Stoll, Changyub Paek, Peter W. Carr. Fast gradient elution reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode-array detection as a high-throughput screening method for drugs of abuse. I. Chromatographic conditions. //Journal of Chromatography A. 2006. -v.1137. - pp.153–162.
40. Sarah E.G. Porter, Dwight R. Stoll, Changyub Paek, Sarah C. Rutan, Peter W. Carr. Fast gradient elution reversed-phase liquid chromatography with diode-array detection as a high-throughput screening method for drugs of abuse. II. Data analysis. //Journal of Chromatography A. 2006. - v.1137. -pp.163–172.
41. Thomas Grobosch, Lena Schönberg, Björn-Thoralf Erxleben. Automated Screening of Basic Drugs in Human Urine by HPLC-PDA with On-Line Extraction. 2007. [Электронный ресурс]
<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/article>
42. Вершинин В.И., Дерендяев Б.Г., Лебедев К.С. Компьютерная идентификация органических соединений. М.: Наука. 2002. - с. 180.
43. Зенкевич И.Г., Сравнительная характеристика условий однозначности хроматографической идентификации органических соединений.
//Журнал аналитической химии. - Том 56, № 9. 2001. - С. 915-924.
44. Peter J. Ulintz, Bernd Bodenmiller, Ruedi Aebersold, Philip C. Andrews, Alexey I. Nesvizhskii. A statistical model for improving probability scores of coupled MS² and MS³ mass spectrometry data. [Электронный ресурс] 55th ASMS07: American Society of Mass Spectrometry. June 3-7, 2007. Indianapolis, IN
45. Franke, J. P., de Zeeuw, R. A., and Schepers, P. G. A. M. Retrieval of Analytical Data and Substance Identification in Systematic Toxicological Analysis by the Mean List Length Approach. //Journal of Forensic Sciences,

- JFSCA, Oct.1985. - Vol. 30, No. 4. - pp. 1074-1081.
46. P.J. Ulintz, B. Bodenmiller, R. Aebersold, P.C. Andrews, and A.I. Nesvizhskii, Investigating MS2-MS3 matching statistics: A model for coupling consecutive stage mass spectrometry data for increased peptide identification confidence. [Электронный ресурс] Mol. Cell. Proteomics 2008, 7(1). - pp.71-87.
 47. Snyder L.R., Dolan J.W. Adjusting Conditions for a Routine Reversed-Phase HPLC Assay, Part I: Changing the Column. //LCGC North America, 2004. - Vol. 22, No. 12. - pp. 1146-1152.
 48. Milton D. Chromatographic Characterization of a Highly Retentive Stationary Phase. //American Laboratory. 2011, August. - pp. 34-35.
 49. Зенкевич И.Г. Формирование базы данных по индексам удерживания лекарственных веществ в обращенно-фазовой ВЭЖХ. //Ж. прикладной химии. - Т.67, №11. 1994. - С. 1877-1882.
 50. Hill D.W., Kind A.J. Reversed-Phase Solvent-Gradient HPLC Retention Indexes of Drugs. //J. Analyt. Toxicology. 1994. - Vol. 18. - pp. 233-242.
 51. Baram G.I. Portable liquid chromatograph. I. Aims. //J. Chromatography A. 1996. - Vol. 728. - pp. 387-399.
 52. Грачев М.А., Барам Г.И., Азарова И.Н. МВИ "Массовая концентрация УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии". Лимнологический институт СО РАН. Иркутск, 2003. Свидетельство об аттестации № 37-03 от 10.12.2003 г. № ФР.1.31.2003.00950
 53. Каламбет Ю.А., Козьмин Ю.П., Мальцев С.А. Как получить правильный спектр хроматографического пика. М.: Партнеры и конкуренты. 2005. № 4. - С. 27-29.
 54. Andrews R.W., Richardson H. Effect of spectral resolution, detector linearity and chromatographic resolution on peak purity calculations. //J. Chromatogr. A. 1994. - Vol. 683. - pp. 3-8.

55. Polster J., Sauerwald N., Feucht W., Treutter D. New methods for spectrometric peak purity analysis in chromatography. //J. Chromatogr. A. 1998. - Vol. 800. - pp. 121-133.
56. Bogomolov A, McBrien M. Mutual peak matching in series of HPLC-DAD mixture analyses. //Analytica Chimica Acta. 2003. - Vol. 490. - pp. 41-58.
57. Fell A.F., Scott H.P., Gill R., Moffat A.C. Computer-Aided Multichannel Detection in High-Performance Liquid Chromatography. //Chromatographia. 1982. - Vol. 16, No. 1. - pp. 69-78.
58. McCalley D.V. Effect of temperature and flow-rate on analysis of basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column. //J. Chromatogr. A. 2000. - Vol. 902. - pp. 311-321.
59. Maier R.D., Bogusz M. Identification Power of Standardized HPLC-DAD System for Systematic Toxicological Analysis. //J. Analyt. Toxicology. 1995. - Vol. 19. - pp. 79-83.
60. Jaufmann L. Validation of analysis results using diode array detection combined with a chromatography data system. //Analysis Magazine. 1998. - Vol. 26, No. 2. - pp. M22-M24.
61. Хубер Л. Применение диодно-матричного детектирования в ВЭЖХ. М.: Мир. 1993. - С. 96.
62. Baker J.K., Skelton R.E., Ma C-Y. Identification of Drugs by HPLC with Dual Wavelength Ultraviolet Detection. //J. Chromatography. 1979. - Vol. 168. - pp. 417-427.
63. Baram G.I., Grachev M.A., Komarova N.I., Perelroyzen M.P., Bolvanov Yu.A., Kuzmin S.V., Kargaltsev V.V., Kuper E.A. Micro-column liquid chromatography with multi-wavelength photometric detection. I. The Ob-4 micro-column liquid chromatograph. //J. Chromatogr. 1983. - Vol. 264. - pp. 69-90.
64. Jinno K., Kuwajima M. Microcomputer-Assisted Liquid Chromatographic

- Separation System: Application to Toxic Compounds Identification in Poisoned Human Fluids. //J. Chromatogr. Science. 1989. - Vol. 27, February. - pp. 57-62.
65. McDowall R.D. Validation of Chromatography Data Systems. Meeting Business and Regulatory Requirements. //UK, Cambridge, The Royal Society of Chemistry. 2005. – 294 p.
 66. Рудаков О.Б. и др., Спутник хроматографиста, Под ред. Селеменова В. Ф. Воронеж: Водолей. 2004. - 528 с.
 67. Хроматография. Основные понятия. Терминология. / Под ред. Даванкова В.А. М.: Комитет научной терминологии РАН. Сборники научно-нормативной терминологии. 1997. Вып. 114. С. 20, 48 с.
 68. Каргер Б. Связь теории и практики в высокоскоростной жидкостной хроматографии. / В кн. "Современное состояние жидкостной хроматографии" (под. ред. Киркланда Дж.). М.: Мир. 1974. С.14.
 69. Г.И.Барам, И.Н.Азарова, Е.В.Кулябина, О.Л.Рутенберг, Метрологическое обеспечение баз данных. Исследование и выбор веществ-маркеров для контроля мертвого объема хроматографической колонки. Материалы III Международной научно-практической конференции "Обеспечение единства измерений физико-химических и оптико-физических величин" Киев, 2008
 70. Martin M., Blu G., Eon C., Guiochon G. The use of syringe-type pumps in liquid chromatography in order to achieve a constant flow-rate. / J.Chromatogr. 1975. - V.112. - pp.399-414
 71. Барам Г.И. Развитие метода микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии и его применение для исследования объектов окружающей среды. / В кн. "100 лет хроматографии" (под. ред. Руденко Б.А.). М.: Наука. 2003. - С.32-60.
 72. Б.А. Руденко, Г.И. Руденко. Высокоэффективные хроматографические

- процессы. М.: Наука. 2002. ч. 12, С. 16
73. John W. Dolan. Why Do Peaks Tail? // [Электронный ресурс] LC-GC North America, chromatographyonline.com 2003. - Vol. 21, No 7. - pp. 612-616.
74. HPLC Qualification Optional Tests and Variances. Agilent Technologies, Inc. [Электронный ресурс] 2012. www.agilent.com/chem/enterprise
75. OMCL Network of the Council of Europe QUALITY MANAGEMENT DOCUMENT. Qualification of Equipment Annex 1: Qualification of HPLC equipment PA/PH/OMCL (11) 04. 2011
76. Г.И. Барам, И.Н. Азарова, Л.А. Кожанова, Е.В. Кулябина, О.Л. Рутенберг, Метрологическое обеспечение баз данных. Исследование и выбор веществ-маркеров для контроля погрешности установки длины волны спектрофотометрического детектора УФ-диапазона хроматографической системы. Материалы Международной научно-практической конференции "Метрология-2009". Минск. 2009
77. Г.И. Барам, И.Н. Азарова, Е.В. Кулябина, О.Л. Рутенберг, Метрологическое обеспечение баз данных ВЭЖХ-УФ. Исследование и выбор веществ-маркеров для контроля свободного объема хроматографической колонки, //Заводская лаборатория. 2010. - № 2. (том 76). - С.66-70.
78. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. М.: Мир. 1989. – 399 с.
79. Г.И.Барам, И.Н.Азарова, Е.В.Кулябина, О.Л.Рутенберг, Разработка методов исследования комплекса веществ с унифицированными хроматографическими характеристиками и создание базы данных, необходимых для идентификации сложных органических веществ. Исследование и выбор веществ-маркеров для контроля значения рН элюента. //Законодательная и прикладная метрология. 2010. - № 1 (107). - С. 13-17.

80. Краткая химическая энциклопедия. Том 3. М.: Государственное научное издательство "Советская энциклопедия". 1964. – с. 502.
81. US National Library of Medicine [Электронный ресурс]
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>
82. Добош Д. Электрохимические константы. М.: Мир. 1980. - С.144,152.
83. Справочник химика. Том III. М.: Химия. 1965. - С. 86, 93, 102
84. Краткая химическая энциклопедия. Том 1. М.: Государственное научное издательство "Советская энциклопедия". 1961. - С.30, 1012
85. Р. Досон. Справочник биохимика. М.: Мир. 1991. - с. 39.
86. US National Library of Medicine, ChemIDplus, [Электронный ресурс]
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+genetox>
87. Ударов Б.Г., Куликов В.И. Исследование хроматографических процессов. М.: НИИТЭХим. 1982. - С.35.
88. Другов Ю.С. Экологическая аналитическая химия. М.: Изд-во "Анатолия". 2000. - С.48-64.
89. Ю.А. Кудеяров, Е.В. Кулябина, О.Л. Рутенберг.
Применение критерия Стьюдента для определения достоверности идентификации веществ при хроматографическом анализе.
//Законодательная и прикладная метрология2013. № 3.- С. 44-48
90. Szepesy, L. Phenomenological Approach to the Mechanism of Retention in RP HPLC // Chromatogr. 2002. - Vol. 56. - P. S-31 - S-39.
91. Zhang Y., Xie W.-P., Chen C.-H., Lin L. Rapid screening for 61 central nervous system drugs in plasma using weak cation exchange solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection. //African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011, - Vol. 5, No. 6, - pp. 706-720.
92. Петков А.П. Разработка алгоритмов работы и методического обеспечения компьютерного тренажера «Жидкостный хроматограф»,

Диплом // НГУ, Новосибирск. 2008. - С.9-11

93. Dimov, N., Stoev, St. A new approach to structure-retention relationships // Acta Chromatogr. 1999. - No 9. - pp. 55 – 65
94. Dimov, N. An alternative approach to the calculation of structure-chromatographic retention relationships // Acta Chromatogr. 2000. - No 10. - pp. 39 - 55
95. Шатц, В.Д., Сахартова, О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии / под ред. Страдыня, Я.П. Рига.: Зинатне. 1988. - 201 с.
96. Jandera, P., Churacek, J. Gradient elution in column liquid chromatography. Theory and practice / ed. Jandera. P. - Amsterdam: Elsevier. 1985. - pp. 59-142.
97. Quarry, M.A., Grob, R.L., Snyder, L.R. Measurement and use of retention data from high-performance gradient elution. Correction for “non-ideal” processing originating within column // J. Chromatogr. 1984. - № 285. - pp. 19-51.

Методика
приготовления аттестованной смеси «БД-2012» и установления
спектральных и хроматографических параметров, воспроизводимых
компонентами смеси

Настоящая методика регламентирует процедуру приготовления и аттестации пятикомпонентной смеси «БД-2012» и установления спектральных и хроматографических параметров, воспроизводимых компонентами этой смеси.

Аттестованная смесь «БД-2012» предназначена для контроля параметров высокоэффективных жидкостных хроматографов серии «Милихром» при идентификации и измерении массовой доли УФ-поглощающих веществ.

1 Средства измерений, реактивы и материалы

1.1 Средства измерений

Хроматограф жидкостный "Милихром А-02" с колонкой хроматографической из нержавеющей стали, заполненной обращено-фазовым сорбентом С18, тип "БД-2003" по ТУ 25-7405.0040-95

Весы лабораторные, класс средний по ГОСТ OIML R 76-1-2011

Пипетки градуированные 1-1-2; 5-1-1; 5-1-5; 5-1-10; 5-1-25 по ГОСТ 29227-91; 1-1-10; 1-1-20 по ГОСТ 29169-91

Колбы мерные 2-25-2; 2-50-2; 2-100-1; 2-200-2; 2-250-2; 2-500-2 по ГОСТ 1770-74

Стакан вместимостью 1 дм³ по ГОСТ 10394-63

1.2 Вспомогательные устройства

Шкаф сушильный "СНОЛ" ГОСТ 13474-79

Дистиллятор, тип "ДЗ -4-2М" ТУ 64-1 -721 -79

Мембраны фильтровальные пористостью 0,45 мкм, тип НА, производства "Millipore Corporation", США

1.3 Реактивы и материалы

Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72

Ацетонитрил для ВЭЖХ, "сорт 0" или "сорт 1" НПК "Криохром", С.-Петербург

Метанол, "х.ч.", ГОСТ 6995-77

Кислота соляная, стандарт-титр ТУ 6-09-2540-72

Натрия гидроокись, "х.ч." ГОСТ 4328-77

Перхлорат лития, тригидрат, номер по каталогу ALDRICH 20,530-3

Кислота хлорная, 70%, номер по каталогу ALDRICH 32,043-9

Кофеин, содержание основного вещества $\geq 99,0$, квалификация ч., для ВЭЖХ, безводный, %, производитель Fluka, номер по каталогу 27600

Иодид калия, содержание основного вещества $\geq 99,5$ %, , квалификация хч или чда, СО ISO, производитель Sigma-Aldrich, номер по каталогу 30315

мета-Нитроанилин, содержание основного вещества 98,0 %, Fluka, номер по каталогу 72670,

Пирен, содержание основного вещества 99,0 % , производитель Sigma, номер по каталогу 82648

орто-Нитроанилин, содержание основного вещества 99,0 % , производитель Fluka, номер по каталогу 72660

1.4 Программное обеспечение

Программа обработки результатов измерений, содержащая базу данных "БД-2003" аттестованных хроматографических и спектральных параметров УФ-поглощающих веществ.

Примечание: Допускается использование средств измерений, оборудования и материалов, отличающихся от указанных в перечне, но не уступающих им по характеристикам.

2 Требования безопасности

При выполнении операций по настоящей методике соблюдают требования безопасности, регламентированные:

- правилами работы в химических лабораториях (работа с концентрированными кислотами, хромовой смесью, щелочами, органическими растворителями).

- "Руководством по эксплуатации" хроматографа "Милихром А-02";

3 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-химика, навыки и опыт работы в химической лаборатории, прошедших обучение хроматографическим методам анализа, стажировку на хроматографе "Милихром А-02" и изучивших настоящую методику.

4 Условия выполнения измерений

При приготовлении смеси и выполнении измерений выполняют следующие условия окружающей среды:

- температура воздуха: от 18 °С до 25 °С;
- атмосферное давление (84-107) кПа ((630-800) мм рт.ст.);
- относительная влажность воздуха от 30 % до 80 %;

5 Приготовление аттестованной смеси БД-2012

5.1.1 Подготовка посуды

Используемую посуду тщательно моют хромовой смесью, последовательно ополаскивают водопроводной и дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу при температуре (120-150) °С.

5.1.2 Вещества, используемые для приготовления тестовой смеси:

Калия иодид

орто-Нитроанилин

мета-Нитроанилин

Кофеин

Пирен

Все вещества взвешивают с точностью до четвертого знака после запятой, результаты взвешивания заносят в протокол.

5.2 Приготовление раствора *орто*-Нитроанилина и *мета*-Нитроанилина с массовой концентрацией 2 мг/мл каждого в 50 % растворе ацетонитрила в воде с объёмным соотношением 50:50 (раствор D).

В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят по 0,20 г *орто*-Нитроанилина и *мета*-Нитроанилина, добавляют около 80 мл 50 % раствора ACN, перемешивают. Доводят объем раствора до метки 50 % раствором ACN.

5.3 Приготовление раствора кофеина с массовой концентрацией 10 мг/мл в воде и раствора KI с массовой концентрацией 2 мг/мл в воде (раствор E)

В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 1,0 г кофеина и 0,20 г KI, добавляют около 80 мл дистиллированной воды, перемешивают. Доводят объем раствора до метки дистиллированной водой.

5.4 Приготовление раствора пирена с массовой концентрацией 2 мг/мл в ацетонитриле (раствор F)

В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 0,20 г пирена, добавляют около 80 мл ацетонитрила. Колбу с раствором пирена на 120 минут помещают на магнитной мешалке. Затем доводят объем раствора до метки ацетонитрилом.

5.5 Пипеткой градуированной 1-1-2 по ГОСТ 29227-91, 1-1-10 или 1-1-20 по ГОСТ 29169-91 отбирают по 10 мл каждого раствора (D, E, F) в мерную колбу вместимостью 100 мл, перемешивают. Доводят до метки 50 % раствором ацетонитрила. Раствор фильтруют через мембранный фильтр пористостью 0,45 мкм.

Метрологические характеристики аттестованной смеси БД-2012 приведены

в таблице П.1.

Таблица П.1.

Наименование компонента	Массовая концентрация, мг/мл	Границы относительной погрешности, % (P=0,95)
Калия иодид	0,2	± 1,2
Пирен	0,2	± 1,0
Кофеин	1,0	± 0,8
мета-Нитроанилин	0,2	± 1,2
орто-Нитроанилин	0,2	± 1,1
Растворитель: смесь ацетонитрила с водой с объемной долей ацетонитрила 50 %		

5.6 Аттестованную смесь "БД-2012" хранят в герметично закрытых стеклянных емкостях при комнатной температуре не более 12 месяцев.

6 Приготовление элюента "А"

6.1 Раствор № 1 (4,1М водный раствор перхлората лития).

В стакан вместимостью 1 дм³ вносят 330 г LiClO₄·3H₂O, растворяют в дистиллированной воде при перемешивании и нагревании до 50 °С (конечный объем 450 см³), количественно переносят раствор в мерную колбу вместимостью 500 см³, охлаждают до комнатной температуры и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор фильтруют через мембранный фильтр пористостью 0,45 мкм.

6.2 Раствор № 2 (4М водный раствор LiClO₄ в 0,1М HClO₄).

2,2 см³ хлорной кислоты вносят стеклянной пипеткой вместимостью 5 см³ в мерную колбу вместимостью 250 см³ и доводят до метки раствором № 1, приготовленным по 6.1.

6.3 Раствор № 3 (элюент "А").

10 см³ раствора № 2, приготовленного по 6.2, вносят стеклянной

пипеткой в мерную колбу вместимостью 200 см³, доводят объем раствора до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Состав полученного раствора: 0,2М LiClO₄-0,005М HClO₄.

7 Установление спектральных и хроматографических параметров, воспроизводимых компонентами смеси "БД-2012" .

7.1 Спектральные и хроматографические параметры, воспроизводимые компонентами смеси "БД-2012", и их назначение перечислены в табл. П.2.

Таблица П.2

Вещество	Наименование параметра X	Контролируемые характеристики хроматографа
Калия иодид	Объем удерживания, мкл	Свободный объем
Кофеин	Спектральное отношение S_{260}/S_{280}	Линейный диапазон детектора
<i>мета</i> - Нитроанилин	Спектральное отношение S_{260}/S_{230}	Пригодность элюента А
Пирен	Спектральное отношение S_{220}/S_{210}	Точность настройки детектора в диапазоне от 210 нм до 300 нм
	Спектральное отношение S_{230}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{240}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{250}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{260}/S_{210}	

	Спектральное отношение S_{280}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{300}/S_{210}	
<i>орто</i> - Нитроанилин	Объем удерживания, мкл	Отклонение градиента от заданной формы
	Площадь пика, S_{210}	Точность дозирования образца
	Асимметрия пика, $A_{10\%}$	Нарушения в упаковке колонки

Спектральные характеристики компонентов смеси установлены на основании закона Бугера-Ламберта-Бера; хроматографические (объемы удерживания, высоты, удельные площади и коэффициенты асимметрии пиков) определены на хроматографе «Милихром А-02» экспериментально на колонке, заполненной сорбентом С18, типа БД-2003.

7.2 Режимные параметры хроматографа "Милихром А-02":

Элюент "А" - раствор № 3

Элюент "Б" - ацетонитрил

Длина волны детектора (λ) 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм

Расход элюента 100 мкл/мин

Температура термостата колонки 40 °С

Постоянная времени 0,18 с

Конфигурация анализа:

промывка иглы "вкл."

промывка инжектора "вкл."

объем буфера "откл."

Метод однолучевой

Режим нормальный

Кювета верхняя

Напряжение переменного тока,

питающего хроматограф

220⁺²²₋₃₃В

Аттестованную смесь "**БД-2012**" объемом 4 мкл вводят при помощи автосамплера в хроматограф и хроматографируют при градиентном элюировании с параметрами, приведенными в таблице 3. Максимальное давление во время хроматографирования не должно превышать 5,0 МПа. Если давление больше указанного значения, производят замену входного фильтра в колонке.

Таблица П.3

Степень градиента (шаг)	Объем, мкл	Доля элюента "Б", %
Регенерация	800	5
0	0	5
1	4000	100
2	4300	100

Метрологические характеристики спектральных и хроматографических параметров, воспроизводимых компонентами смеси "**БД-2012**", оценены по результатам межлабораторного эксперимента и приведены в таблице П.4.

Таблица П.4

Вещество	Наименование параметра X	Аттестованное значение параметра	Границы относительной погрешности, %, P=0,95	Предел повторяемости, %, r (n=2, P=0,95)	Предел воспроизводимости, %, R (m=2, P=0,95)
Калия иодид	Объем удерживания, мкл	144	± 1	0,2	0,6
Кофеин	Спектральное отношение S_{260}/S_{280}	0,76	± 2	2	2
<i>мета</i> -Нитроанилин	Спектральное отношение S_{260}/S_{230}	0,60	± 4	2	3
Пирен	Объем удерживания, мкл	3301	± 2	1	2
	Спектральное отношение S_{220}/S_{210}	1,135	± 2	1	3
	Спектральное отношение S_{230}/S_{210}	3,525	± 4	5	5
	Спектральное отношение S_{240}/S_{210}	6,032	± 3	2	4
	Спектральное отношение S_{250}/S_{210}	1,067	± 1	1	1
	Спектральное отношение S_{260}/S_{210}	1,867	± 2	1	1
	Спектральное отношение	0,404	± 1	1	2

	S_{280}/S_{210}				
	Спектральное отношение S_{300}/S_{210}	0,583	± 2	1	2
орто-Нитроанилин	Объем удерживания, мкл	1525	± 4	2	4
	Выходной сигнал, S_{210} , е.о.п.·мкл	24,8	± 4	3	6
	Асимметрия пика, $A_{10\%}$	1,04	± 7	3	8

Метрологические характеристики методики

Метрологические характеристики методики установлены при анализе пятикомпонентной аттестованной смеси БД -2012, компоненты которой воспроизводят хроматографические и спектральные параметры в диапазонах и с показателями точности, приведенными в таблице 1.5.

Таблица 1.5.

№ п/п	Наименование параметра X	Диапазон измерений	Показатель точности (границы погрешности измерений) при P=0,95		Предел повторяемости, (n=2, P=0,95)		Предел воспроизводимости, (m=2, P=0,95)	
			относит., δ , %	абсолют., Δ	относит., r , %	абсолют., $r_{\text{абс}}$	относит., R, %	абсолют., $R_{\text{абс}}$
1	Массовая концентрация	0,2	± 8		4		8	

	анализируе мого вещества в пробе, мг/мл							
2	Удельная площадь пика анализируе мого вещества , S_{a210} , <u>е.о.п.·мкл</u> мг/мл	125- 1250	± 4		3		5	
3	Объем удерживани я V_R , мкл	150- 4300	± 7		4		8	
4	Спектральн ое отношение S_λ / S_{210}	0,10- 1,00 св.1,00- 10,0	± 4	$\pm 0,03$	4	0,02	8	0,03
5	Площадь пика S_{210} , е.о.п.·мкл	25-250	± 3		3		5	

Благодарности

Я выражаю глубокую благодарность и искреннюю признательность своему научному руководителю кандидату химических наук Рутенберг Ольге Липовне, без помощи и постоянной поддержки которой не состоялась бы эта работа.

Я глубоко благодарю своего научного консультанта Барама Григория Иосифовича за его бесценную помощь, за огромное количество консультаций и разъяснений по этой работе.

Я искренне признательна за поддержку, помощь и участие в организации моей работы Перельройзена Михаила Петровича и всех сотрудников Института хроматографии «ЭкоНова».

Я признательна кандидату химических наук Фаткудиновой Шаде Решадовне и всем сотрудникам отдела метрологического обеспечения физико-химическим измерений ФГУП «ВНИИМС», и лично Пибалку Валерию Владимировичу, за поддержку и советы по этой работе.

Глубокая благодарность доктору технических наук, профессору Кононогову Сергею Алексеевичу за постоянную поддержку в работе над диссертацией.

Искренняя благодарность доктору технических наук, профессору Исаеву Льву Константиновичу за его искреннее участие, советы и всестороннюю помощь по настоящей работе.

Глубокая благодарность доктору физико-математических наук, профессору Кудярову Юрию Алексеевичу за советы и поддержку и всем сотрудникам лаборатории метрологического обеспечения биологических и информационных технологий.

Глубокая благодарность моей семье Морозову В.Ю., PhD Морозову Алексею, Морозовой Валерии, Штановой З.П., Кулябину В.В., к.т.н. Кулябиной Т.В. за терпение и бесценную поддержку в написании и работе над диссертацией.