



**ЗАО Институт хроматографии
ЭкоНова**



**ХРОМАТОГРАФ ЖИДКОСТНЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ
"Милихром А-02"**

Программа математической обработки хроматографической информации

"АльфаСпектр"

Версия 1.2

Руководство пользователя

ЯПМИ 1544.2.00.0.0-2 РЭ

Редакция 1.14 от 04.12.2014

**г. Новосибирск
2015 г.**

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
Функции, выполняемые пакетом ПО "АльфаСпектр":	3
ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ ПЕРВИЧНОЙ ОБРАБОТКИ	5
Общее знакомство с программой	5
Запуск программы	5
Общий вид и главное меню	5
Система Меню	6
Диалоговые и иные окна	7
Хроматограммы и методы обработки	8
Открытие, импорт, сохранение и экспорт хроматограмм	8
Окно хроматограммы	9
Информация о хроматограмме	9
Настройка графика хроматограммы	10
Настройка графиков "По умолчанию"	11
"Зуммирование" графика хроматограммы	12
Изменение графиков всех открытых хроматограмм	12
Настройка атрибутов линий графика	13
Обработка хроматограммы	14
МЕТОД обработки	14
РАЗМЕТКА ХРОМАТОГРАММЫ НА ПИКИ И ИНТЕГРИРОВАНИЕ	16
Автоматическое интегрирование пиков	16
Определения	16
Параметры алгоритма интегрирования	16
Настройка параметров интегрирования	18
Фильтрация сигналов	19
События интегрирования	20
Задание и редактирование событий интегрирования	21
Редактор пиков	21
КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ	25
Цель хроматографического анализа	25
Идентификация пиков	25
Однопараметрическая детекция	25
Многоволновая детекция	25
Спектральные отношения	26
Градуировка хроматографа	27
Методы градуировки	27
Градуировочные точки	28
Метод внешнего стандарта (Абсолютная градуировка)	28
Метод внутреннего стандарта	29
Градуировка методом внутреннего стандарта	29
Расчет методом внутреннего стандарта	29
ПРОВЕДЕНИЕ ГРАДУИРОВКИ ХРОМАТОГРАФА.....	31
Введение в процедуру градуировки	31

Этап 1. Получение градуировочных хроматограмм	31
Этап 2. Создание таблицы компонентов	32
Заполнение таблицы компонентов	33
Этап 3. Создание таблицы концентраций	33
Заполнение таблицы концентраций	34
Этап 4. Получение градуировочной зависимости	35
Вид градуировочного графика	36
Сохранение градуировки. Использование градуировки	36
Отчет о градуировке	36
ОТЧЕТЫ	37
Назначение и формы отчетов	37
Стандартный отчет. Управление отчетом	37
Разделы отчета	39
Справочная информация о МЕТОДАХ анализа и обработки	39
Таблица пиков - результат обработки	40
Выбор формул расчетов	42
РАБОТА С БАЗОЙ ДАННЫХ ВЭЖХ-УФ	44
Унифицированная хроматографическая методика и БД	44
Методы анализа, обработки данных и валидации БД-2003	44
Валидация МЕТОДА и выполнение анализов	45
Формирование отчетов при работе с БД-2003	46
Идентификация пиков	46
Настройка отчета по БД-2003	46
Стандартный отчет БД-2003	46
Пользовательская форма отчёта по БД-2003	47
Отчет по валидации	49
Назначение столбцов отчета по валидации	49
Назначение строк отчета	50
Мастер распознавания	51
Параметры идентифицируемого пика	51
Поиск кандидата на идентификацию	52
Результаты поиска. Отчет о поиске	52
Внесение вещества в Базу данных	53
Формирование базы данных	54
Информация о веществе	54
Спектры (спектральные отношения) веществ	54
Пополнение Базы Данных	55
Импорт и экспорт баз данных	55
Приложения	
1. Спектральный угол	57
2. Алгоритм расчета шумов	58

ПРЕДИСЛОВИЕ

Программный пакет "АльфаСпектр" предназначен для использования совместно с управляющим пакетом "АльфаХром" в составе хроматографа "Милихром А-02" (ЯПМИ 1544.11823101.02-11 ТУ) для решения широкого круга хроматографических задач в лабораторных, заводских или полевых условиях.


Настоящее Руководство пользователя предназначено для оказания помощи тем, кто осваивает программное обеспечение (ПО) "АльфаСпектр". Оно включает все наиболее существенные вопросы, необходимые для работы с программой: как оптимизировать процедуру *интегрирования* (разметки) хроматограммы, провести *градуировку* системы, получить печатный *отчет*. При этом рассматривается минимальный набор параметров, установка которых абсолютно необходима на каждом этапе.



Принципы и особенности функционирования хроматографа "Милихром А-02" подробно рассмотрены в Техническом описании и руководстве по эксплуатации хроматографа ЯПМИ 1544.2.0.0.00. РЭ. Предполагается, что Пользователь хорошо знаком с упомянутым документом. В некоторых случаях даны ссылки по типу "см. ТО и РЭ".



Особенности функционирования ПО "АльфаСпектр", важные для получения однозначных и корректных результатов, помечены, как данные абзацы.

Справочная информация находится в файле подсказки. Если Вы заинтересуетесь значением каких-либо параметров текущего диалогового окна или пункта меню - щелкните левой кнопкой мыши по пиктограмме  и в открывшейся странице оглавления перейдите к нужной информации.



Существенную помощь в освоении основ хроматографии и принципов математической обработки хроматографических данных может оказать Компьютерный тренажер «Жидкостный хроматограф», демо-версия которого размещена на сайте Econova.ru : <http://econova.ru/applications/production/production.php>.

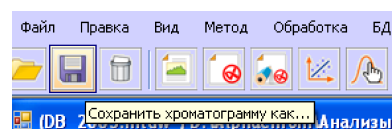
Тренажер эмулирует работу хроматографа «Милихром А-02» и позволяет "хроматографировать" пробы, состав которых определяет сам пользователь согласно списку веществ. Он дает возможность менять состав подвижной фазы, осуществлять изократический и градиентный режимы элюции, менять температуру колонки, объем пробы, параметры детектора и т.д.

Функции, выполняемые пакетом ПО "АльфаСпектр":

- Первичная обработка хроматограмм - определение положения, высоты и площади пиков.
 - ✓ Выявление до 2000 хроматографических пиков.
 - ✓ Автоматическая разметка пиков с настройкой алгоритма отбора пиков.
 - ✓ Расчет параметров хроматографических пиков с выбором расчетных формул.
 - ✓ Возможность задания индивидуального алгоритма для отдельных участков хроматограммы.
 - ✓ Ручная коррекция разметки.
- Идентификация и определение концентрации компонентов разделяемых смесей.
 - ✓ Автоматическая идентификация компонентов анализируемой смеси.
 - ✓ Градуировка методом внешнего стандарта,
 - ✓ Градуировка методом внутреннего стандарта (автоматическая компенсация погрешностей пробоподготовки и ввода пробы).

- ✓ Одноточечная и многоточечная градуировка.
- ✓ Расчет абсолютных и относительных концентраций.
- Хранение, повторная обработка и обмен хроматографической информацией.
 - ✓ Сохранение параметров обработки для каждой хроматограммы.
 - ✓ Возможность пересчета хроматограммы с измененными параметрами обработки.
 - ✓ Формирование отчетов.
 - ✓ Вывод отчета на экран, на принтер и запись его в виде файла.
 - ✓ Экспорт отчетов для обработки текстовыми и графическими редакторами.
- Пополнение существующей или **формирование собственной Базы Данных**.
 - ✓ Идентификация веществ по временам удерживания и по спектральным характеристикам, содержащимся в Базе данных "ВЭЖХ-УФ".
 - ✓ При количественных расчетах по веществам, содержащимся в БД "ВЭЖХ-УФ" НЕ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ стандартные образцы.
 - ✓ Валидация (контроль) метода проводится по аттестованной смеси.
 - ✓ Методики формирования и использования баз данных занесены в Федеральный реестр методик выполнения измерений.
- Метрологическое обеспечение в виде утвержденной ВНИИМС методики периодической проверки хроматографа ЯПМИ 1544.2.00.0.0 И10

ОБЩЕЕ ЗНАКОМСТВО С ПРОГРАММОЙ



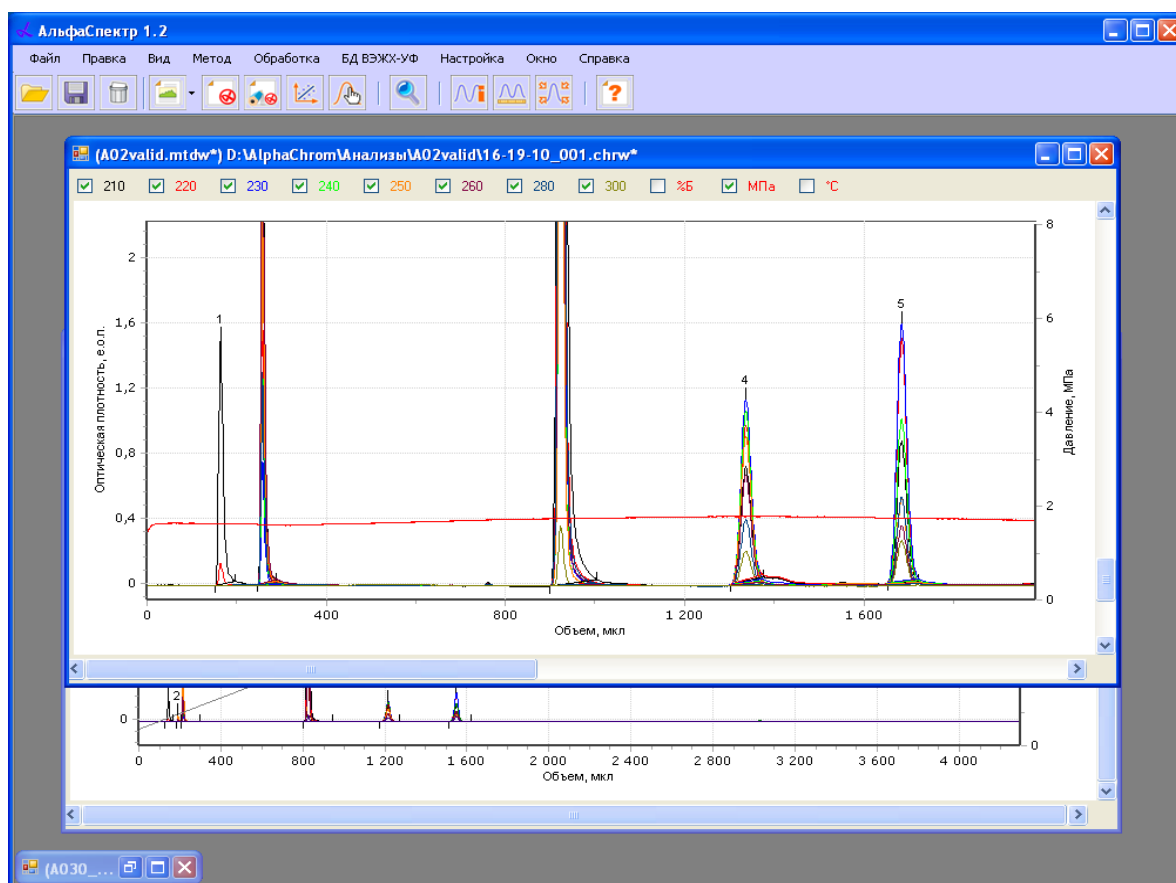
Запуск программы



Так как программа "АльфаСпектр" интегрирована в программно-управляющую систему хроматографа "Милихром А-02", то, как правило, она не имеет самостоятельной иконки для запуска¹. Вход в программу осуществляется через управляющую программу "АльфаХром" после щелчка левой кнопкой мыши² по пиктограмме, изображенной в начале абзаца, или через меню *Обработка/Обработать в АльфаСпектр*. Активная хроматограмма будет передана в обрабатывающую программу и на экране появится ее основное окно с хроматограммой. Переход к обработке возможен как во время выполнения хроматограммы, так и в любое другое время.

Общий вид и главное меню

После запуска программы на экране появляется *главное окно* программы "АльфаСпектр" с серым полем, предназначенным для просмотра хроматограмм. Верхняя линейка окна - это *заголовок*, содержащий эмблему программы, ее название и номер версии, а также стандартные системные кнопки MS WINDOWS *Свернуть*, *Развернуть* и *Закрыть*.



Вторая строка содержит *главное меню* программы "АльфаСпектр". *Главное меню* обеспечивает доступ ко всем функциям системы. Для вызова меню щелкните мышкой по нужному пункту и далее через выпадающие меню и субменю перейдите к нужной функции.

Ниже находится линейка пиктографического меню, содержащая пиктограммы

1 Такую же иконку можно создать на рабочем столе и для автономного запуска.

2 Далее эта операция для краткости будет называться "щелкните мышью"



наиболее часто используемых команд и операций. Чтобы получить подсказку о назначении какой-либо пиктограммы, установите на нее указатель мышки, при этом пиктограмма выделится дополнительной рамкой, а под ней появится всплывающая подсказка с наименованием исполняемой функции.

Остальное пространство *главного окна* - рабочая область. Она может содержать одну или несколько хроматограмм. Число открытых хроматограмм не должно превышать 100.

Каждая хроматограмма располагается в своем окне. Одно из них является активным (текущим), его заголовок выделяется синим цветом. Все манипуляции по обработке данных возможны только с хроматограммой в активном окне. Чтобы сделать одно из нескольких окон активным, установите курсор мыши внутри окна и щелкните левой кнопкой мыши.

Существует несколько стандартных для WINDOWS способов расположения окон на экране, выбираемых через меню **Окно**: каскадное расположение окон, вертикальная или горизонтальная мозаика. Расположение окон типа "мозаика" удобно при визуальном сравнении однотипных хроматограмм.

Положение и размеры каждого окна хроматограммы могут быть изменены произвольным образом, как это принято в WINDOWS. При перезапуске программы "АльфаСпектр" восстанавливаются стандартные положение и размеры окон хроматограмм.

Для манипуляций с окном хроматограммы, аналогично основному окну, задействованы кнопки . Активное окно можно закрыть, развернуть на все рабочее окно или свернуть, тогда свернутые окна будут расположены в нижней части *главного окна* в виде значков - пиктограмм с заголовками и стандартными значками управления . Любое из свернутых окон можно либо развернуть до прежнего размера, либо до полного, либо удалить, щелкнув мышью по соответствующему значку.

И пиктограммы и развернутые окна можно перемещать в пределах главного окна.

Система Меню

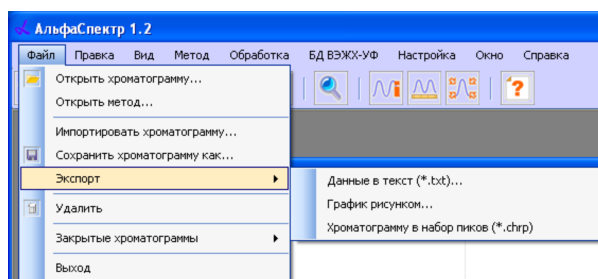
Главное меню "АльфаСпектр" обеспечивает доступ ко всем функциям системы через *Меню* и *Субменю*..

Назначение основных пунктов главного меню следующее:

- **Файл** - предназначено для работы с файлами хроматограмм.
- **Правка** - обеспечивает копирование хроматограммы в буфер.
- **Вид** - предназначено для изменения внешнего вида хроматограмм.
- **Метод** - обеспечивает формирование МЕТОДА обработки хроматограммы, формирование и получение отчета.
- **Обработка** - обеспечивает ручную обработку (разметку пиков) хроматограмм.
- **БД ВЭЖХ-УФ** - обеспечивает работу с базой данных ВЭЖХ-УФ (БД-2003) и получение отчетов.
- **Настройка** - позволяет произвести настройки графиков.
- **Окно** - предназначено для управления окнами хроматограмм и получения дополнительной информации по ним.
- **Справка** - предназначено для получения справки по функциям и работе программы и справки о разработчиках.

Для вызова меню щелкните мышкой по нужному пункту, появится выпадающий список, в котором перечислены группы выполняемых функций или конкретные функции и команды.

Пункты меню, подразумевающие наличие вспомогательного *Субменю* помечены черным треугольничком справа. Открытие субменю осуществляется перемещением указателя



мышью вправо. Далее щелчком мыши можно перейти к нужной функции.

Если строка меню заканчивается много-точием (например, **Открыть метод...**) – это означает, что при выборе строки откроется *диалоговое окно*. Если же строка меню заканчивается пробелом (например, **Сохранить метод**), это означает что при выборе строки производится непосредственно обозначенное действие.

В открываемся меню в голубом поле слева представлены пиктограммы, которые дублируют данную функцию, и для удобства доступа в увеличенном виде они вынесены в отдельную строку пиктографического меню.


В некоторых окнах, появляющихся в процессе работы программы, для удобства пользователей встроены *контекстно-зависимые меню*, которые вызываются щелчком правой кнопки мыши в то время, когда указатель мыши находится в рабочем поле окна, см., например, рисунок на стр. 12.

Диалоговые и иные окна

В программе использованы два типа *Диалоговых окон*. Первый тип является стандартным для системы WINDOWS, они предназначены для навигации по папкам на дисках и выбора конкретного файла (МЕТОДА, хроматограммы, отчета и др.). Другие *Диалоговые окна* используются для ввода и редактирования параметров обработки, они могут служить также для получения от пользователя ответов типа да/нет и команд на выполнение действия или на переход в *Диалоговое окно* следующего уровня.



Как правило, в верхней строке окна содержится *заголовок* (название) окна. Поля, доступные для редактирования, выделены белым цветом. Для редактирования щелкните в нужном месте мышкой или используйте [Tab] или [Shift]+[Tab] для перехода к следующему (предыдущему) полю. Основными элементами диалогового окна могут быть текстовые, числовые и списочные поля, флажки и переключатели.



Текстовые поля допускают ввод произвольного текста и являются описательными.



Числовые поля допускают ввод только чисел. Для принятия введенных значений не требуется нажатия клавиши [Enter], можно просто переходить к следующему полю. Эти поля могут содержать кнопки с треугольниками типа  для ускорения ввода числа.

Если в окне количество строк с текстовыми или числовыми полями превышает 3 – 5 в едином поле, справа появляется *полоса прокрутки*, как на рисунке справа, которая обеспечивает просмотр и редактирование ранее скрытых строк.




Списочные поля, имеющие справа кнопку , могут принимать только допустимые значения. Щелкните по кнопке  и выберите требуемое значение из списка.

Флажки могут принимать только два значения: *включено/выключено*. Флажки отмечаются серыми или белыми квадратами . Каждый такой флажок устанавливается независимо от состояния других флажков. Щелкните мышкой по значку, чтобы изменить значение на противоположное. Если флажок установлен, в квадрате появляется "галочка" .

Переключатели . Переключатели позволяют выбрать только один из приведенных вариантов. Выбранный вариант отмечается значком .

Диалоговое окно может содержать несколько *командных кнопок*, расположенных в нижней или правой части окна. При нажатии на такую кнопку будет выполнена соответствующая операция. Наиболее часто встречаются следующие стандартные кнопки:

- **ОК** - принимает все сделанные изменения и закрывает окно. То же самое происходит при нажатии клавиши [Enter].
- **Закреть** - отменяет все сделанные изменения и закрывает окно. Можно выполнить ту же процедуру, щелкнув мышью по кнопке  или нажав клавишу [Esc].
- **Принять** - принимает все изменения без выхода из диалогового окна – это позволяет просмотреть результат и продолжить редактирование.
- **Помощь** - вызов пояснительной информации.

ХРОМАТОГРАММЫ И МЕТОДЫ ОБРАБОТКИ

Открытие, импорт, сохранение и экспорт хроматограмм


Все данные, полученные во время одного хроматографического процесса, вместе с сопутствующей информацией по их получению (т.е. МЕТОД *анализа*), хранятся в едином файле исходной хроматограммы. Имя файла создается автоматически на основе имени МЕТОДА, даты и времени начала сбора хроматографических данных и имеет расширение **.chrw* (подробно см. ТО и РЭ).



Исходная хроматограмма может поступить на обработку в "Альфаспектр" только через ИМПОРТ хроматограммы.

Открыть в программе "АльфаСпектр" можно только файл ранее обработанной и сохраненной хроматограммы с расширением **.chrw*

Импорт осуществляется двумя путями.

Во-первых, можно после получения хроматограммы в окне программы "АльфаХром" нажать пиктограмму  или через меню **Обработка** выбрать функцию **Обработать в АльфаСпектр**. И в том и в другом случае откроется окно программы "АльфаСпектр" с импортированной хроматограммой в главном окне.

Во-вторых, можно через главное меню **Файл/ Импорт хроматограммы** выйти в стандартное для WINDOWS диалоговое окно **Открыть**, затем по имени МЕТОДА анализа, дате и имени найти нужный файл и открыть его.

После импорта хроматограммы и ее обработки (и даже без обработки) ее можно сохранить (функция **Сохранить хроматограмму как...** в меню **Файл**) с тем же или иным именем, в той же или иной папке. Хроматограмма будет сохранена с расширением **.chrw*.

При открытии хроматограммы на экране, как правило возникает информационное поле с прогресс-индикатором, как показано справа. Т.к. в процессе открытия сразу производится разметка хроматограммы на пики, процесс может занимать до 30 секунд.

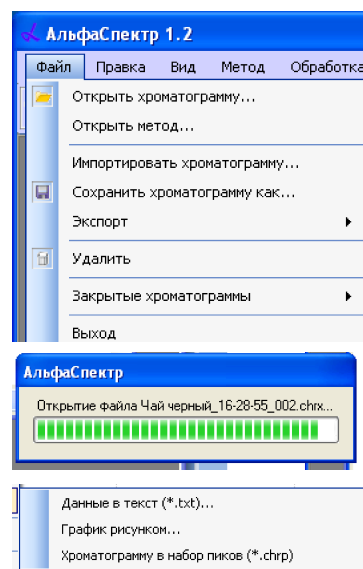
При выборе функции **Экспорт** открывается субменю (справа). Для обеспечения возможности дополнительной обработки хроматограммы, например, в Excel'e или в другой пользовательской программе, хроматограмма может быть экспортирована в текстовый файл с разделителями для последующего импорта в выбранную программу, подробнее это описано в ТО и РЭ.

Для использования в текстовом или графическом документе хроматограмма может экспортироваться в наиболее распространенных форматах: **.bmp*, **.jpg* и др. функция **График рисунком...**

Так же хроматограмма может быть экспортирована в специальный формат **.chrp* ("набор пиков") для последующего импорта ее в компьютерный тренажер "Жидкостный хроматограф" (о тренажере - см. Предисловие на стр. 3).

В любом случае экспортируемый файл размещается в той же папке, где находится "родительская" хроматограмма, если в диалоге сохранения не было сделано иное назначение.

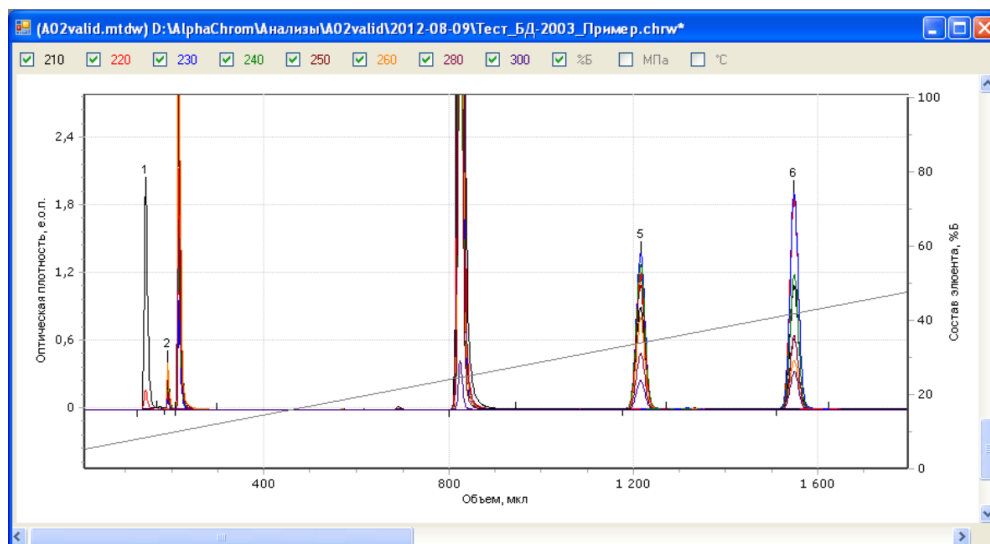
В меню **Закрытые хроматограммы** содержится список десяти последних СОХРАНЕННЫХ и закрытых хроматограмм для облегчения возврата к ним с целью просмотра или повторной обработки. Существует возможность их быстрого открытия нажатием комбинации [ctrl 1], [ctrl 2] [ctrl 3] и т.д. При этом "1" – последняя, "2" – предпоследняя и т.д. хроматограммы.



Окно хроматограммы

Окно хроматограммы содержит следующие элементы.

Первая строка - *Заголовок* – содержит: в скобках имя файла МЕТОДА *обработки* (может не совпадать с именем метода *анализа*), далее указано расположение и имя файла хроматограммы (подробнее о файловой системе см. ТО и РЭ). Заканчивается строка стандартными кнопками: **Свернуть**, **Развернуть** и **Заккрыть**.




Во второй строке содержится легенда хроматограммы.

Перечень длин волн с "флажками" (в диапазоне от 190 до 360 нм), при которых была получена данная хроматограмма, позволяет отобразить на графике только желаемые длины волн (или все). Цвет рисуемой линии профиля хроматограммы соответствует цвету длины волны в легенде (о выборе цветов – см. ниже). Хроматограмма отображается либо в координатах "время – оптическая плотность", либо "объем – оптическая плотность". Выбор оси – см. ниже "Настройка графика". Хроматограмма открывается в том виде и масштабе, в котором она была сохранена на диске.

Если хроматограмма в окне видна не полностью, снизу и справа появляются полосы прокрутки, позволяющие увидеть недостающие части хроматограммы.

Флажки "%B", "МПа" и "°C" позволяют отобразить один из трех дополнительных параметров, регистрируемых во время хроматограммы: форму заданного³ градиента концентрации элюента Б, давления в жидкостной системе или температуру термостата колонки.

Информация о хроматограмме

При выборе в главном меню пункта **Окно\Информация**, или при нажатии на пиктограмму  панели инструментов или через контекстное меню открывается окно "*Информация*" (см. рисунок). В этом окне содержатся сведения о файле хроматограммы, открытом в активном окне, и условиях, в которых этот файл был получен. Окно является информационным и не позволяет менять какие-либо настройки.

³ В "Милихром'е А-02" задается градиент применительно ко входу в смеситель. Реальный градиент, получаемый на входе в колонку, имеет задержку 210 – 220 мкл, обусловленную объемами смесителя и коммуникаций от выхода из смесителя до фильтра колонки.

Окно содержит следующие данные:

- Дата** - дата и время начала записи хроматограммы.
- Файл** - полный адрес и имя файла хроматограммы.
- Оператор** - имя оператора, записавшего хроматограмму.
- Метод** - название МЕТОДА, использованного при получении хроматограммы.
- Колонка** - параметры использованной хроматографической колонки.
- Элюент А** - название элюента А.
- Элюент Б** - название элюента Б.
- Образец** - описание и объём введённого в колонку образца.
- Буфер** - объём введённого в колонку буфера (предобразца).
- Детектор** - перечислены длины волн детектирования, время измерения, метод измерения, и рабочая кювета.
- Температура** - температура термостата колонки.
- Макс. давление** - максимальное давление в жидкостной системе во время элюции.
- Комментарий** - комментарий оператора.

Информация								
Дата	24 apr 2013, Ср 17:01:47							
Файл	D:\Alphachrom\Анализы\Тест4_30_100_A-02\2013-04-24\17-06-12_001.chrx							
Оператор	Ю.Болванов							
Метод	Тест4_30_100_A-02.mid							
Колонка	D = 2 мм, L = 75 мм, dp = 5 мкм, "ProntoSII-120-5-C18 AQ", №121_1							
Элюент А	Вода							
Элюент Б	Ацетонитрил							
Образец	2 мкл Тест 4, пробирка №6							
Буфер	0 мкл							
Детектор	250, 270 нм, Время 0,18 сек, метод измерения - двулучевой, рабочая кювета пробы							
Температура	0 °C							
Макс. давление	7,4 МПа							
Комментарий	Альфакром А-030 в реж. А-02 (нов) с термост. от А-02							
Шаг	Рег.	0	1	2	3	4	5	6
Объем, мкл	600	0	1300	1900				
Б, %	30	30	100	100				
Поток, мкл/мин	200	200	200	200				

В нижней части окна приведена таблица градиента, который использовался при записи хроматограммы. Каждой стадии хроматограммы и каждой ступени градиента соответствует свой столбец таблицы:


- шаг – стадия хроматографического цикла (регенерация и нанесение пробы) и номер ступени от 1 до 20;
- объём подвижной фазы, расходуемый к окончанию текущей ступени (нарастающим итогом);
- объёмная доля элюента Б в подвижной фазе к концу текущей ступени (шага);
- скорость потока элюента.

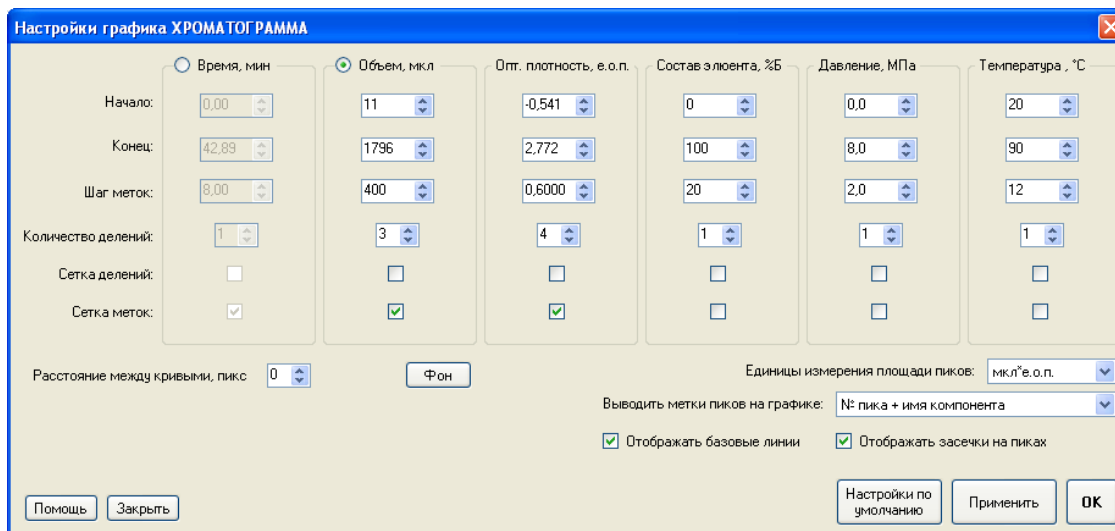
Настройка графика хроматограммы

Настройку осей хроматограммы можно выполнить несколькими путями и с различными последствиями. Можно:

- настроить оси и вид графика только в активном окне,
- изменить все графики открытых хроматограмм по образцу активного окна,
- изменить настройки графика "по умолчанию". С такими настройками будут открываться все импортируемые хроматограммы, т.е. хроматограммы для первичной обработки по данному МЕТОДУ.

Новый внешний вид графика после настройки сохраняется при сохранении хроматограммы.

Для настройки осей и вида графика в активном окне следует выбрать в главном меню пункт **Вид/ Настроить график в активном окне**, или выбрать пункт **Настройка/ Настройки графика**, или щелкнуть по пиктограмме  на панели инструментов, или же выбрать пункт **Настроить график** в контекстном меню (т.е. после щелчка правой кнопкой мыши). Откроется окно "*Настройки графика ХРОМАТОГРАММА*".



Это окно аналогично подобному окну в управляющей программе "АльфаХром" (см. ТО и РЭ), за несколькими исключениями.

Здесь присутствует выпадающий список **Единицы измерения площади пиков**, позволяющий задать единицы измерения:

*мкл*е.о.п.* (микролитр, умноженный на единицы оптической плотности) – единицы, пропорциональные количеству компонента в пробе. Подробнее – см. *Настройка параметров интегрирования*;

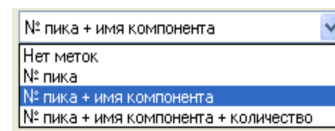
*мин*е.о.п.* (минуты на единицы оптической плотности) – единицы, так же пропорциональные количеству компонента в пробе, но зависящие от скорости потока элюента, и потому - менее удобные.

Выпадающий список **Выводить метки пиков на графике** позволяет выбрать один из четырех вариантов меток, которые будут отображаться на графике в вершинах пиков:

Нет меток: метки на графике не отображаются.

№ пика: отображается только номер пика.

№ пика + имя компонента: вместе с номером пика отображается имя компонента, если оно задано в меню **Метод/Градуировка**. Если имя компонента не задано, то отображается только номер пика.



№ пика + имя компонента + количество: вместе с номером пика и именем компонента отображается концентрация вещества в пробе, соответствующая данному пику. Единицы измерения концентрации задаются в меню **Метод/ Градуировка** и **Таблица концентраций**.

"Флажок" **Отображать базовые линии** – определяет, показывать или нет на графике часть базовой линии, расположенную в границах пиков. Если выключено, то часть базовой линии, расположенная между засечками границ пиков, не будет отображаться.

"Флажок" **Отображать засечки на пиках** – позволяет показывать или нет на графике метки, обозначающие границы пиков.

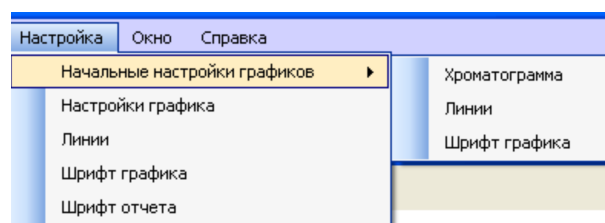
Нажатие кнопки **Применить** позволяет посмотреть на графике изменения его внешнего вида, и продолжить изменение вида графика, или при удовлетворительном результате - принять изменения после нажатия кнопки **ОК**. Нажатие кнопки **Закреть** приводит к выходу из окна и сбросу всех изменений.

Нажатие на кнопку **Настройки по умолчанию** приведет график к виду заводской настройки или к Вашему наиболее часто используемому, если вы ранее задали таковой.

"Некруглые" цифры в окнах объема и оптической плотности отражают масштаб, установленный в результате "зуммирования" (см. ниже).

Настройка графиков "По умолчанию"

Для настройки режима отображения графика хроматограммы "по умолчанию" следует выбрать в главном меню пункт **Настройка/ Начальные настройки графиков/ Хроматограмма**. Откроется *окно "Настройки графика ХРОМАТОГРАММА по умолчанию"*, полностью аналогичное вышеописанному.

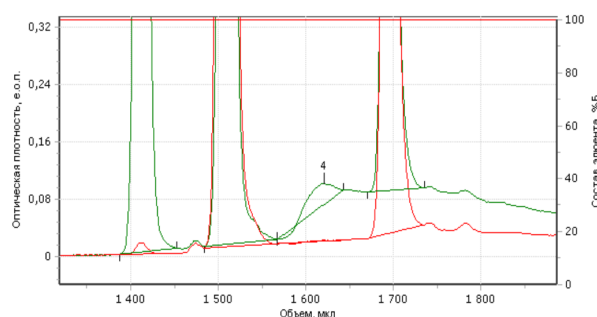


В этом окне настраиваются параметры внешнего вида хроматограмм, которые автоматически применяются к вновь импортируемым хроматограммам. Вид окна полностью аналогичен вышеописанному, за исключением того, что кнопки **Настройки по умолчанию** и **Применить** заменены кнопкой **Сохранить**. При ее нажатии введенные изменения сохраняются, и в дальнейшем будут использоваться как установки "по умолчанию" вместо заводских настроек.

Аналогично настраиваются атрибуты линий (см. ниже) и шрифты, используемые на графиках и в отчетах.


"Зуммирование" графика хроматограммы

Кроме описанного выше способа существует и другой, более оперативный, способ изменения масштаба представления хроматограммы – "зуммирование" участка хроматограммы. Для этого выбирается начальный участок хроматограммы, зажимается левая кнопка мыши и движением вправо-вниз очерчивается нужный регион, который будет растянут на всё окно, как показано на рисунке.



"Зуммирование" можно повторять последовательно несколько раз до получения желаемого результата. Между актами "зуммирования" можно воспользоваться полосами прокрутки, выбирая нужный участок хроматограммы.

Чаще всего, после "зуммирования" засечки на осях будут "некруглые", с четырьмя значащими цифрами. При необходимости, (например, при выдаче печатного отчета) их можно округлить, воспользовавшись опцией **Настройки графика**.

Отменить результаты "зуммирования" можно либо через главное меню **Вид/Показать график полностью**, либо нажатием пиктограммы , либо движением курсора мыши вправо-вверх (или влево-вверх) в поле хроматограммы при нажатой левой кнопке.

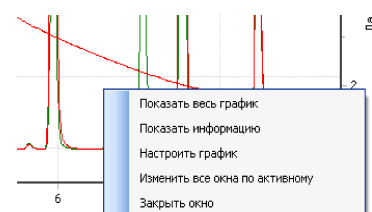


"Зуммирование" изменяет масштаб графика по основным осям, но НЕ затрагивает масштаба вспомогательных осей.

Изменение графиков всех открытых хроматограмм

Щелчок правой кнопкой мыши в поле хроматограммы открывает контекстно-зависимое меню (рис. на следующей странице), которое, в частности, через команду **Изменить все окна по активному**, позволяет одновременно и единообразно изменить графики всех открытых хроматограмм по образцу активного окна, которое было должным образом "зуммировано".

В результате применения этой функции может оказаться, что в некоторых окнах график хроматограммы не будет виден. Это случается из-за изменения объемов удерживания пиков, либо смещения базовой (нулевой) линии хроматограммы.



Эта команда не затрагивает типа вспомогательной оси:

%Б, МПа или °С, но изменяет их масштаб (если он был изменен в активном окне), даже если данная ось в настоящий момент в других окнах не задействована.

Остальные строки этого меню для удобства дублируют ранее описанные функции.

Настройка атрибутов линий графика

"На вкус и цвет товарищей нет". Поэтому рекомендуется на начальном этапе работы для настройки цвета, типа и толщины всех линий на графике через меню **Настройка/ Начальные настройки графиков/ Линии** открыть окно "*Настройки графика ЛИНИИ по умолчанию*", подобрать желаемые типы и цвета линий и сохранить их. Далее они будут применены для всех вновь импортируемых хроматограмм.

Под словами "Канал 1" ... "Канал 8" имеются ввиду любые длины волн, примененные в любой хроматограмме, в порядке возрастания. Указанным цветом наносится надпись у флажка длина волны в легенде и отрисована кривая оптической плотности.

Цвет линии выбирается щелчком мыши по соответствующему цветному прямоугольнику, после чего открывается дополнительное окно выбора цвета, выбирается новый, и выбор подтверждается кнопкой **ОК**. Система позволяет пользоваться стандартными цветами или создать собственную палитру.

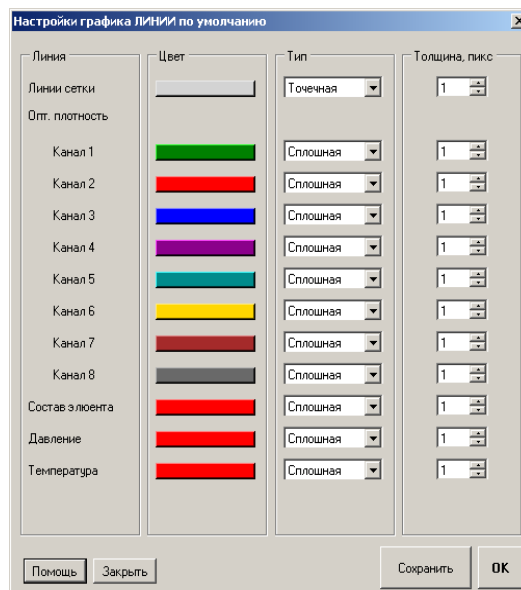
Тип каждой линии (штрих, точечная и пр.) задается из выпадающего списка **Тип**, а толщина – из числового поля **Толщина**.

Иногда по тем или иным причинам, чаще всего – для печати отчета на черно-белом принтере, желательно (или даже необходимо) переназначить цвето-графическое представление хроматограммы. Для этого из главного меню **Настройка** вызывается функция **Линии**, и открывается окно "*Настройка графика ЛИНИИ*", аналогичное вышеописанному, отличающееся только тем, что вместо кнопки "Сохранить" есть кнопки "Применить" и "Настройки по умолчанию". Первая позволяет применить только что выбранные вами атрибуты линий, а вторая – вернуться к атрибутам "по умолчанию" (см. выше).

☞ Выбранные атрибуты действуют только на активное окно. Они сохраняются при сохранении хроматограммы, но только для этой хроматограммы.

Функция **Изменить все окна по активному аналогичным образом** изменяет атрибуты графиков на всех ОТКРЫТЫХ хроматограммах.

Шрифты, используемые на графиках, настраиваются стандартным для WINDOWS способом. Шрифты, используемые в отчетах, настраиваются так же стандартным способом через меню **Настройка\Шрифт отчета**.



Обработка хроматограммы

Обработка данных включает в себя процедуры: автоматическое *детектирование* пиков (разметка), *интегрирование пиков* (расчет площадей) *идентификация пиков*, *расчет концентраций* компонентов, *фильтрация шумов*, *выдача отчета*, а также специальные процедуры, которые описаны ниже.

Полученные "сырые" данные хранятся в памяти компьютера в исходном виде, без какой-либо обработки (файлы с расширением *.chrх). Обработанные копии исходной хроматограммы хранятся в той же папке в файлах с тем же именем (если не были специально переименованы) с расширением *.chrw.

Процедура автоматического поиска пиков (*интегрирование*) использует величину первой производной кривой оптической плотности на опорной длине волны (канале), заданной в *параметрах разметки хроматограммы*. Процедура поиска может быть настроена и оптимизирована как с помощью *параметров разметки*, так и *событий интегрирования*. Если результаты автоматической разметки на пики Вас не удовлетворяют и Вам не хочется настраивать (подбирать) параметры, то можно воспользоваться *редактором пиков*. Эта процедура дает возможность вручную создавать или удалять пики, расщеплять или объединять их, быстро перемещать начало, конец или вершину пика, и т.д.

Идентификация пиков и градуировка основаны на *Таблице компонентов*, включающей в себя название компонентов, времена (объемы) удерживания, градуировочные коэффициенты, индексы удерживания и так далее. Таблица компонентов создается на базе градуировочных измерений. Возможно выполнение как односточечных, так и многоточечных градуировок методами Внешнего стандарта (Абсолютной градуировки) или Внутреннего стандарта. Таблица компонентов является частью МЕТОДА обработки и вместе с остальными разделами метода хранится в файле хроматограммы. Таким образом, повторная обработка старых данных дает тот же результат, что и обработка сразу же после регистрации хроматограммы.

В случае необходимости, для увеличения кажущегося отношения сигнал/шум, может быть проведена фильтрация первичных данных. В программе "**АльфаСпектр**" используются два алгоритма цифровой фильтрации данных: фильтрация по Гауссу и фильтрация по медиане.

Процедура формирования *отчета* обеспечивает возможность модификации отчета таким образом, чтобы его форма соответствовала требованиям (пожеланиям) пользователя. *Отчет*, записанный в файл, может быть включен в любой текстовый процессор или импортирован в популярные электронные таблицы или базы данных. Имеется функция предварительного просмотра отчета.

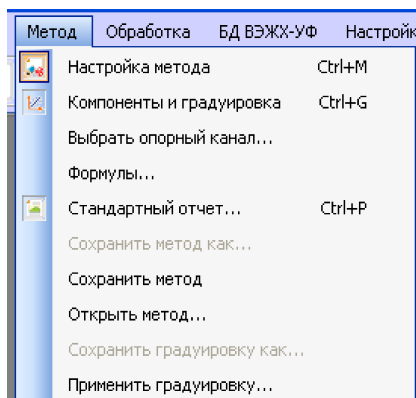
При работе с Базой данных ВЭЖХ-УФ БД-2003 применяются дополнительные виды обработки и формируются особые отчеты, которые описаны в главе **Работа с базой данных ВЭЖХ-УФ**.

МЕТОД обработки

МЕТОД обработки включает в себя всю информацию, необходимую для обработки данных, получения качественных и количественных результатов, градуировки (калибровки), формирования отчета. МЕТОД может рассматриваться как шаблон хроматограммы и отчета. МЕТОДЫ записываются в специальные файлы с расширением *.mtdw. Как правило, имя МЕТОДА обработки совпадает (если потребитель не предпринял специальных мер) с именем МЕТОДА анализа.

Меню МЕТОДА обработки содержит несколько основных разделов и функций (см. рисунок на следующей странице):

Раздел **Настройка метода**. Этот раздел включает



параметры алгоритма разметки хроматограммы на пики (интегрирования), позволяет задать *события интегрирования*, а также произвести фильтрацию сигнала. Переход к этому разделу (и к двум другим) дублируется пиктограммой в основном меню и приведенными сочетаниями клавиш, которые действуют при любом открытом окне.

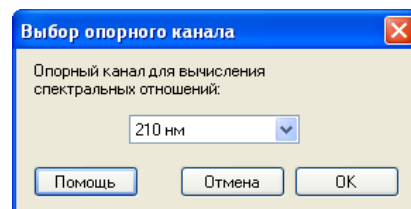
Раздел **Компоненты и градуировка**. В этом разделе редактируются *Таблица компонентов*, *Таблица концен-траций*, а также параметры, влияющие на идентификацию и расчет концентраций компонентов.

Опции *Выбрать опорный канал*⁴ и *Формулы* позволяют выбрать опорную длину волны для расчета спектральных отношений, и формулы, по которым ведутся расчеты хроматографических параметров (эффективность колонки, разрешение и асимметрия). Подробно это описано ниже в гл. "Разметка хроматограммы на пики и интегрирование"

Раздел **Стандартный отчет**. Здесь формируется вид и структура отчета по результатам обработки хроматограммы – см. раздел **Отчеты**.

Функции *Сохранить метод как ...*, *Сохранить метод*, и *Открыть метод...* предназначены для управления файлами созданного и/или существующих МЕТОДОВ обработки.

Функции *Сохранить градуировку как...* и *Применить градуировку...* позволяют управлять полученными графиками градуировки хроматографа. Подробно описано в гл. "Сохранение градуировки. Использование градуировки"



⁴ Задаваемая здесь опорная длина волны используется ТОЛЬКО для расчета *спектральных отношений*, и она может не совпадать с опорной длиной волны, используемой при разметке хроматограммы на пики (см. Параметры алгоритма интегрирования), и с длиной волны (каналом) интегрирования некоторых избранных пиков (см. Заполнение таблицы компонентов).

АВТОМАТИЧЕСКОЕ ИНТЕГРИРОВАНИЕ ПИКОВ

Определения

Величиной, характеризующей содержание компонента в анализируемой смеси, является площадь пика (см. гл. "Идентификация пиков"), ограниченного кривой оптической плотности на одной из длин волн детектирования и основанием пика (базовой линией). Площадь вычисляется в единицах "микролитр, умноженный на единицы оптической плотности" ($мкл * е.о.п.$) или "минуты, умноженные на единицы оптической плотности" ($мин * е.о.п.$).

Для вычисления площади пика необходимо знать точки его начала и конца и положение базовой линии, поэтому одной из наиболее важных процедур обработки является разметка хроматограммы на пики. Процедура поиска пиков и вычисления площадей называется *интегрированием*.

Интегрирование включает в себя операции определения *особых* точек пиков (*начало, конец, вершина, долина*), построение *базовой линии*, вычисление таких характеристик пиков, как время удерживания, высота и площадь.


Программа "АльфаСпектр" имеет встроенный *детектор пиков* для автоматической разметки, дополненный механизмом *событий интегрирования*, а также *редактор пиков* для ручной коррекции разметки.



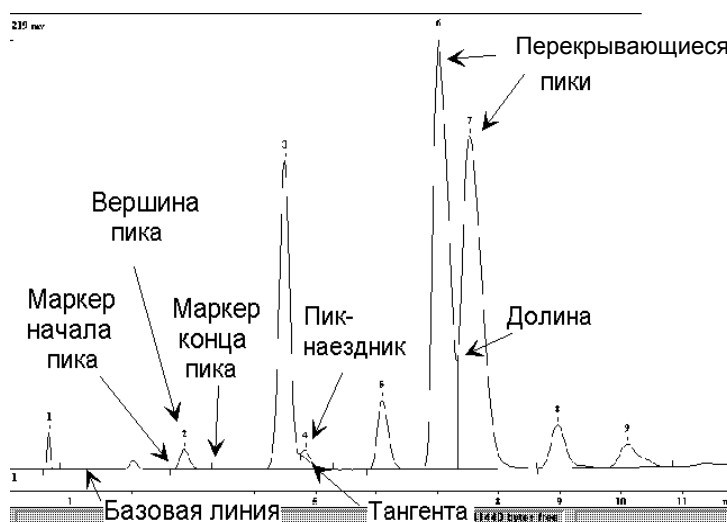
Базовая линия в области, расположенной между пиками, совпадает с профилем хроматограммы, под пиками используется прямая базовая линия. В программе **Альфа Спектр** изломы базовой линии возможны только на границах пиков.

Сверху пики ограничены хроматографической кривой, а снизу - базовой линией. Смежные, или перекрывающиеся пики (неразделенные у основания) объединяются в группу, где конец предыдущего пика совпадает с началом следующего (общая точка называется *долиной*). В этом случае базовая линия начинается в точке, относящейся к началу первого пика, и заканчивается в точке, относящейся к концу последнего пика в группе. Смежные пики разграничиваются вертикальной линией, соединяющей хроматографическую кривую с базовой линией. Так называемый *пик-наездник* отделяется от пика-носителя линией тангенциального спуска (*тангентой*).

Параметры алгоритма интегрирования

Чтобы настроить параметры разметки хроматограммы в активном окне, нужно выбрать в главном меню пункт **Метод/ Настройка метода**, или нажать пиктограмму . В нижней части окна хроматограммы появится панель настройки метода (см. рисунок на следующей стр.).

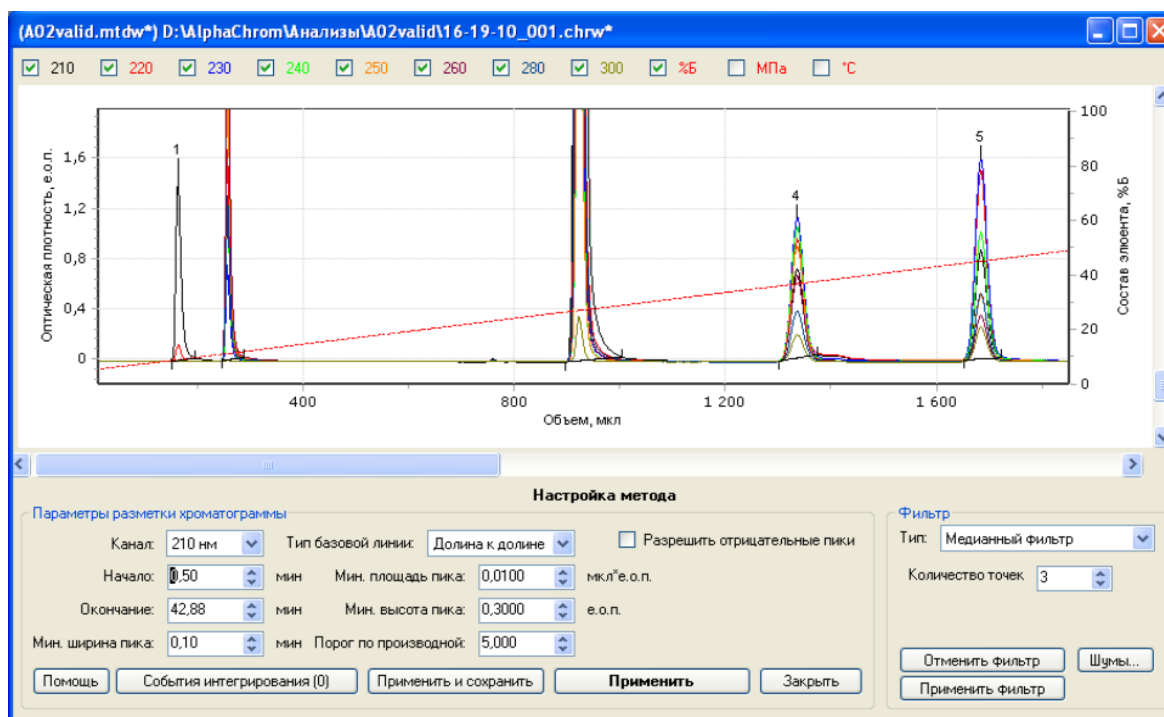
Изменять разметку можно с помощью инструментов, расположенных в поле "*Параметры разметки хроматограммы*". Настраиваются следующие параметры:



Канал – на многоканальных (многоволновых) хроматограммах это опорный канал (опорная длина волны), используемая программой для разметки хроматограммы на пики. По умолчанию этот же канал используется для вычисления всех хроматографических параметров (площадей, высот пиков и т.д.) и спектральных отношений.

Примечания.

- Для вычисления спектральных отношений может использоваться иной опорный канал, задаваемый через меню **Метод/Выбрать опорный канал**, (см. примечание на стр. 15);
- при работе с Базой данных по методике БД-2003 в качестве опорного канала всегда используется канал 210 нм;
- при расчете площадей пиков для повышения чувствительности обнаружения может использоваться так же иной канал – см. гл. " Заполнение таблицы компонентов".



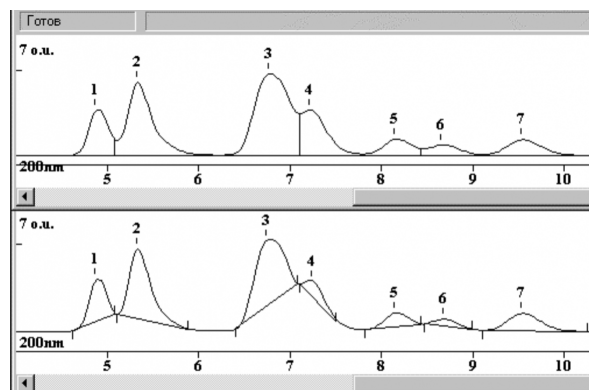
Начало – момент времени начала разметки хроматограммы в минутах. Пики, находящиеся на хроматограмме до указанного момента времени, не регистрируются программой.

Окончание – момент времени окончания разметки хроматограммы в минутах. Пики, находящиеся на хроматограмме после указанного момента времени, не регистрируются.

Мин. ширина пика – минимальная ширина пика в минутах. Пики с шириной менее указанной программой не регистрируются.

Тип базовой линии – пользователь должен выбрать тип базовой линии, который будет использован при расчете площадей:

Ортогональный – ортогональная базовая линия всегда проводится между началом и окончанием хроматограммы или выделенной области на хроматограмме (например, начало и конец *интегрирования*) параллельно оси времени (или объёма) удерживания из той граничной точки, которая расположена ниже по оси оптической плотности. Из второй границы хроматограммы проводится перпендикуляр к базовой линии до пересечения с ней (см. верхнюю хроматограмму).



Долина к долине – в этом случае правая и левая границы каждого пика непосредственно соединяются базовой линией (см. нижнюю хроматограмму).

Понятно, что тип базовой линии влияет на площадь пиков, особенно – для пиков с малой амплитудой, а следовательно, - и на расчет *спектральных отношений* (см. стр. 26). В программе существует возможность задания типа базовой линии для одного или группы пиков через механизм "*Событий интегрирования*" (см. ниже) и возможность индивидуальной установки при ручной разметке (см. Редактор пиков). При этом необходимо помнить, что *События интегрирования* можно внести в МЕТОД обработки (если сохранить МЕТОД), но *События* "привязаны" ко времени выхода, а ручная разметка действует ТОЛЬКО на одну хроматограмму.

Базовая линия в области, расположенной между пиками, совпадает с профилем хроматограммы.

Мин. площадь пика – минимальная площадь пика, мкл*е.о.п., соответствующая опорному каналу. Пики с площадью менее указанной не регистрируются.

Мин. высота пика – минимальная высота пика, е.о.п., соответствующая опорному каналу. Пики ниже указанной высоты не регистрируются.

Порог по производной - распознавание пиков осуществляется на основе первой производной (наклона) хроматографической кривой в месте предполагаемого начала пика. Для того чтобы решить, является ли наклон в некоторой точке значимым, величина первой производной делится на значение шума базовой линии. Вычисленная величина шума базовой линии по каждой длине волны указывается в разделе **Фильтр**. Наклон принимается значимым в случае, если это отношение превышает величину порога по производной, устанавливаемую пользователем. В этой точке ставится метка начала пика. конец пика определяется аналогичным образом.

Пик-наездник⁵ – это маленький пик, расположенный на склоне большего по величине пика (пика-хозяина).

Разрешить отрицательные пики – устанавливает, определяются или игнорируются программой отрицательные пики.

Чтобы закрыть панель настройки, нужно щелкнуть по кнопке **Заккрыть**, или в меню **Метод** - щелкнуть по строчке **Настройка метода**. Заданные параметры будут действительны только для этой хроматограммы.

Чтобы действие внесенных изменений распространилось на последующие хроматограммы, необходимо в меню **Метод** щелкнуть по строчке **Сохранить метод**.

Настройка параметров интегрирования

После завершения задания параметров проверьте разметку хроматограммы на пики и базовую линию, нажав кнопку **Применить**. Если результаты неудовлетворительны, попробуйте настроить параметры разметки для получения желаемой картины. При просмотре действуют функции зуммирования и "показать все".

Установите параметр **Ширина** (величину ожидаемой ширины пика в начале хроматограммы). Пики в конце хроматограммы, как правило, шире, чем в начале. Попробуйте несколько раз изменить параметр и **Применить**. В этом случае часто удается получить приемлемые результаты разметки, даже если исходные параметры были далеки от оптимальных.

Попробуйте изменять параметр **Порог по производной** до тех пор, пока картина не улучшится. Разумная величина параметра **Порог** находится в пределах от 0,5 до 5. Меньшее значение данного параметра обеспечивает большее количество найденных пиков. Лучшим

⁵ В настоящей версии программы пики-наездники не детектируются, а их площадь включается в площадь пика-хозяина, если пик не детектируется как самостоятельный, или его площадь рассчитывается в соответствии с выбранным типом базовой линии. См. пик № 4 на рис. на предыдущей странице.

значением может оказаться 2 или 3 (значение по умолчанию).


Если программа разметит некоторые нежелательные пики, установите параметр **Мин. высота пика** чуть больше, чем высота пиков, которые Вы хотели бы исключить из рассмотрения. Для этой цели можно так же использовать и параметр **Мин. площадь пика**, однако в этом случае труднее оценить требуемое значение параметра.

Напомним, что здесь идет речь о параметрах хроматограммы на выбранной опорной длине волны, заданной в поле **Канал: xxx нм**.

При незначительной **Мин. высоте пика** может оказаться, что внушительный на экране пик не будет включен в число детектируемых. Это означает, что на опорной длине волны у пика малое поглощение, а на некоторых других – большое. Чтобы включить этот пик в таблицу пиков надо последовательно уменьшать предел детектирования и проверять результат кнопкой **Применить**.

Если настройка набора параметров интегрирования не приводит к приемлемой разметке хроматограммы, для достижения желаемого результата могут применяться два подхода: *Редактор пиков* (изменение разметки вручную) и *События интегрирования*. Настройка алгоритма разметки с использованием событий интегрирования имеет смысл, если ожидается ряд хроматограмм со сходными, повторяющимися особенностями базовой линии. В противном случае используется ручная коррекция.

Следует иметь в виду, что в ряде случаев (сложная форма базовой линии, плохое разделение хроматографических пиков, малые пики-наездники, высокий уровень шумов, и т.д.) никакой алгоритм не может гарантировать корректную разметку на пики, поскольку само понятие "пик" во многом субъективно и зависит от конкретной решаемой задачи. В этих случаях правильность получаемых результатов во многом зависит от опыта оператора, но даже при визуальной хорошей разметке появляются дополнительные погрешности.

Для сохранения оптимизированных параметров разметки для будущих анализов сохраните МЕТОД через меню **Метод/Сохранить метод** и перепишите хроматограмму: **Файл/Сохранить хроматограмму как**, или щелкните по пиктограмме . Если вы еще не пришли к окончательному желаемому виду разметки, целесообразно *сохранить хроматограмму* с модифицированным именем, например – добавлением символов типа "_1".

Фильтрация сигналов

Когда аналитический сигнал на хроматограмме сравним по величине с уровнем шума (соотношение сигнал/шум мало), как интегрирование, так и расчет спектральных отношений для идентификации затруднены, а результат определения концентрации вещества в пробе будет неточным. Для решения этой проблемы в программе "**АльфаСпектр**" предусмотрены фильтры, сглаживающие шумы и увеличивающие таким образом соотношение сигнал/шум. Для выбора подходящего фильтра и его параметров в правой нижней части окна *Настройка МЕТОДА* (см. рисунок на стр. 17) есть панель выбора и настройки **Фильтра**:

Пользователю в выпадающем списке **Тип [фильтра]** предложены на выбор опции: "*Не применять сглаживание*" (установлена по умолчанию) и два типа фильтров, алгоритмы работы которых описаны в **Приложении 3**. Результат применения фильтра труднопредсказуем, и иногда не видим. Различия можно видеть либо по поведению базовой линии некоторых пиков при сильном увеличении, либо по количеству детектируемых пиков в обзорном режиме, либо по результатам расчетов при просмотре отчета. Фильтр можно применить многократно, а возможность **Отменить фильтр** возвращает хроматограмму к исходному виду.

Факт применения фильтра к данной хроматограмме индицируется во всплывающей надписи в правом верхнем углу окна хроматограммы.

Медианный фильтр.

При использовании медианного фильтра входной сигнал разбивается на одинаковые блоки (окна) заданного размера и фильтр применяется отдельно к каждому окну. Ширина окна измеряется в точках. Величины входного сигнала внутри окна сортируются в порядке возрастания. Отклик, соответствующий середине окна, заменяется другим значением, попадающим в центр отсортированного массива. Этот метод влияет на хроматографические пики в наименьшей степени, хорошо сглаживает базовую линию, не меняет форму пика на склонах и очень эффективно устраняет отдельные выбросы (в этом случае выброс заменяется на одну из соседних точек). Однако он слегка "приглаживает" вершины пиков и ложбины между пиками и может изменять как высоту, так и площадь хроматографических пиков. В качестве параметра задаётся ширина окна (в точках), т.е. в количестве цифровых отсчетов на каждой длине волны, в пределах от 1 до 10 точек.

Гауссов фильтр.

При использовании гауссова фильтра входной сигнал разбивается на одинаковые блоки (окна) заданного размера и фильтр последовательно применяется отдельно к каждому окну. Ширина окна, измеряется в минутах. Вычисляется среднее взвешенное значение всех точек внутри окна с весом, распределенным по функции Гаусса с центром в середине окна, результат используется как новое значение отклика детектора. Гауссов фильтр, по сравнению с медианным, дает лучшее визуальное сглаживание собственно пиков, но меньше сглаживает шумы базовой линии. Пики после сглаживания становятся ниже и шире, но их площадь при этом не меняется. В качестве параметра задаётся ширина окна (так же в точках).

Нажатие кнопки "**Применить фильтр**" применяет выбранный фильтр к хроматограмме. Нажатие кнопки "**Отменить фильтр**" отменяет его действие. Нажатие кнопки "**Шумы**" открывает плавающее окошко, в котором приведены величины шумов от пика к пику (в единицах оптической плотности) для всех каналов данной хроматограммы.

СОБЫТИЯ ИНТЕГРИРОВАНИЯ

В некоторых случаях невозможно получить удовлетворительную разметку хроматограммы на пики, варьируя параметры автоматического детектора пиков. Как правило, в этих случаях используется ручная коррекция с помощью редактора пиков. Тем не менее, если ожидается серия однотипных хроматограмм, имеет смысл использовать события интегрирования. События интегрирования позволяют настроить процесс разметки в соответствии с особенностями данной серии хроматограмм, задавая для некоторых участков хроматограммы индивидуальные параметры и правила разметки.

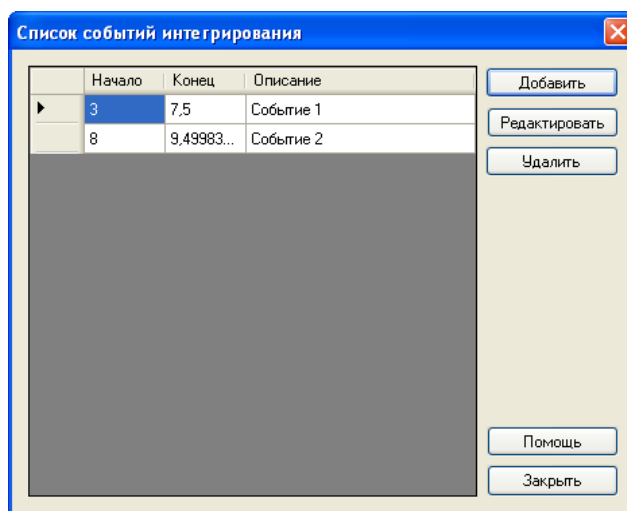
После щелчка по кнопке **События интегрирования** появится список событий интегрирования (по умолчанию список событий пуст). Открывшееся окно содержит таблицу событий интегрирования, состоящую из трёх столбцов:

Начало - момент времени начала события на хроматограмме в минутах.

Конец - момент окончания события на хроматограмме в минутах.

Описание - описание события или его *Имя*, задаваемое пользователем.

Каждая строка таблицы соответствует одному событию интегрирования. Если таблица пуста - событий интегрирования в данном методе нет.



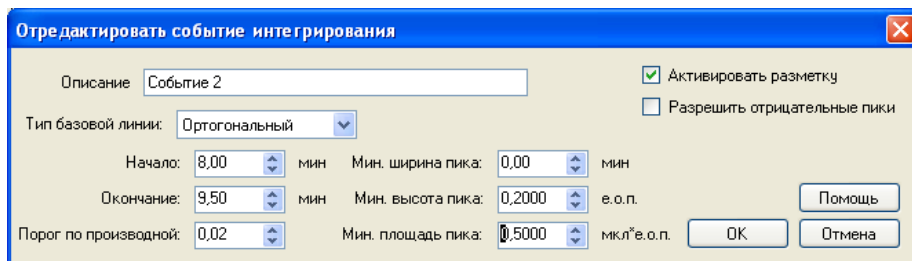
Можно *добавить* или *удалить* событие, а также *изменить* параметры любого из них. После закрытия этого окна в окне настройки разметки в строке *События интегрирования* (2)

в скобках появляется действующее количество событий. По нажатию кнопки **Применить** хроматограмма будет переразмечена и обчислена для оценки влияния сделанных изменений.

Задание и редактирование событий интегрирования

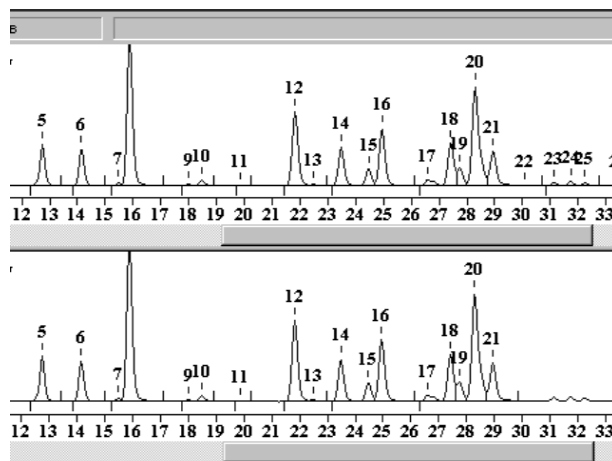
При добавлении события (кнопка **Добавить**) или при редактировании события (кнопка **Редактировать**) появляется окно **Отредактировать событие интегрирования**.

В этом окне можно установить индивидуальный режим интегрирования для участка хроматограммы от момента времени начала события в минутах (**Начало**) до **Окончания** – времени окончания события в минутах.



Все параметры, устанавливаемые для данного события, полностью аналогичны вышеописанным параметрам интегрирования, и это позволяет очень гибко воздействовать на режим разметки. Флажок **Активировать разметку** – позволяет активировать разметку после выхода из режима задания *Событий*.

Запретить/ Разрешить детектирование – можно путем создания события, например, с заданием большой минимальной высоты (или площади). Начиная с указанного момента времени прекращается интегрирование. Если пик начался до данного события, он либо заканчивается досрочно (пики на стадии спуска) либо не принимаются во внимание (пики на стадии подъема). Интегрирование возобновляется, начиная с указанного момента времени (интервал 30 – 33 минуты), как показано на рисунке.



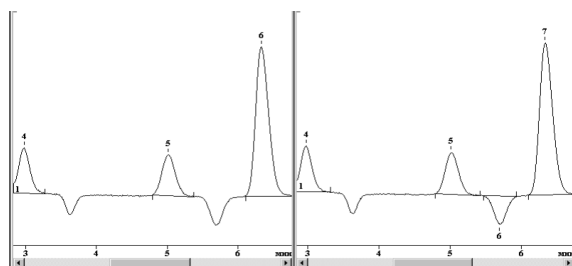
Можно для заданного участка хроматограммы установить индивидуальную ширину пика, или индивидуальный критерий начала/конца пика, индивидуальный характер базовой линии и проч. Изменение типа базовой линии возможно только в момент начала и/или окончания пика.

Разрешить/запретить отрицательные пики

Например, можно разрешить детектирование отрицательных пиков на участке между 5-й и 6-й минутами, как показано на рисунке. При этом концентрации таких компонентов рассчитываются в обычном порядке.


Режим детектирования отрицательных пиков уменьшает устойчивость алгоритма поиска пиков.

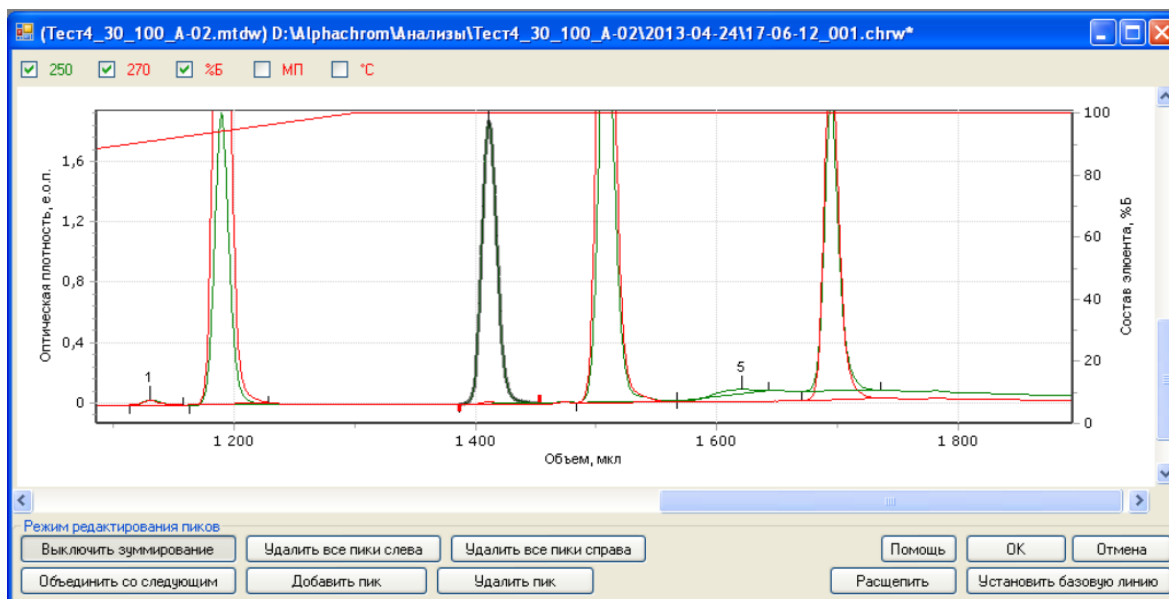
Механизм *событий интегрирования* - это мощный и сложный инструмент, и им целесообразно пользоваться, когда есть (или предполагается) массив сложных хроматограмм.



РЕДАКТОР ПИКОВ

Ручной *редактор пиков*, позволяет создать или уничтожить пик⁶, переместить начало, конец или вершину пика, а также выполнять другие действия по редактированию разметки хроматограммы.

Чтобы вызвать *Редактор пиков*, нужно либо в меню выбрать пункт **Обработка/Редактор пиков**, либо нажать на пиктограмму  на панели инструментов. В нижней части хроматограммы появится панель *Редактора пиков*.



Как правило, при коррекции разметки Вас интересует какой-то пик, или ограниченный участок хроматограммы. Прежде всего необходимо увеличить требуемый фрагмент до удобного размера, на котором хорошо видны существенные для Вас детали. Это выполняется, как было описано выше, при нажатой кнопке **Включить зуммирование**. В этом режиме доступна только функция изменения масштаба хроматограммы.

При **Выключенном зуммировании** нельзя изменять масштаб хроматограммы, однако доступны следующие функции:

Выбрать пик. Чтобы выбрать пик для редактирования, нужно навести на него указатель мыши и один раз нажать левую кнопку мыши. Когда пик выбран, его границы становятся красными, а линии самого пика становятся толще.

Снять выделение пика. Чтобы снять выделение пика, нужно один раз щёлкнуть левой кнопкой мыши в любом месте в поле хроматограммы, под которым отсутствуют пики.



В зависимости от настройки скорости мыши может понадобиться "длительное" (0,2 – 0,3 сек) нажатие кнопки.

Передвинуть границы пика. Для перемещения границы пика необходимо выбрать нужный пик, затем - навести курсор на нужную границу. При наведении на границу курсор изменит вид, вместо стрелочки появится крестик ("прицел"). Чтобы передвинуть границу, нужно зажать левую кнопку мыши и, удерживая её, двигать "прицел" в нужном направлении вдоль базовой линии хроматограммы до того места, где предполагается новая граница. При перемещении никаких видимых изменений не происходит. Изменение границы пика происходит в момент отпускания кнопки мыши.



Граница одного пика не может быть установлена в пределах границ другого пика, а обе границы одного пика не могут находиться по одну сторону от его вершины.

При перемещении "прицела" за допустимые границы курсор превращается в знак

⁶ «Уничтоженный» пик сохранится на хроматограмме, но не будет участвовать в расчетах, представляться в таблицах и т.п.

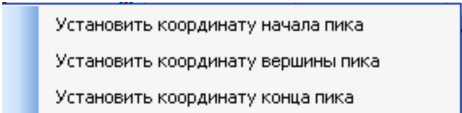
"движение запрещено" (перечеркнутый круг).

Передвинуть вершину пика. Действие, аналогичное передвижению границ пика. При перемещении вершины пика следует учитывать, что нельзя передвигать вершину за пределы границ пика.

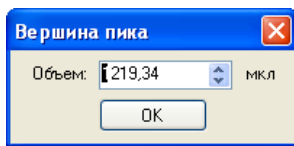


Следует помнить, что операции ручной коррекции пиков не имеют функции "отката" (undo). Кнопка "Отмена" закрывает окно редактирования с отменой ВСЕХ изменений.

Если в поле выделенного пика щелкнуть правой кнопкой мыши, на экране появится *контекстное меню пика* (рис. справа), назначение строк которого понятно из их текста. При выборе любой строки возникает окно соответствующей координаты характерных точек пика (в микролитрах или минутах, в зависимости от оси X. Это окно, во-первых, позволяет точно определить интересующую вас координату, во-вторых, - точно изменить ее, задав нужное значение в цифровом поле.



Установить координату начала пика
Установить координату вершины пика
Установить координату конца пика



Вершина пика

Объем: мкл

OK

Для редактирования пиков используются кнопки, расположенные на панели редактора пиков.

Объединить со следующим – объединяет выбранный пик со следующим справа пиком, отмеченным (т.е., имеющим номер) на хроматограмме. Если пик справа отсутствует, данная кнопка будет неактивна.

Если ранее вы удалили, например, пик №2, намереваясь позже объединить его с пиком №1, то в результате выполнения операции "*Объединить пик №1 со следующим*", Вы получите объединенные пики №№ 1, 2 и 3 и Вам придется выполнить его *расщепление*.

Добавить пик – чтобы разметить новый пик на хроматограмме, нужно нажать соответствующую кнопку, курсор изменит вид – станет крестиком. Необходимо привести курсор на место, куда требуется добавить пик, и один раз щелкнуть левой кнопкой мыши. При добавлении пика программа сама выбирает расположение границ и вершины пика. При необходимости их можно передвинуть, как описано выше. Чаще всего это и надо проделать, т.к. при малой амплитуде пика его границы выбираются с большой погрешностью.

По этой же причине при малой амплитуде при изменении границ пика возможно некорректное определение базовой линии (основания) пика. В этом случае необходимо щелкнуть мышкой по кнопке "Установит базовую линию" и еще раз щелкнуть в отрывшемся списке.

Удалить пик – удаляет разметку выбранного пика. После этого данный пик перестаёт определяться программой. Если пик не выбран, данная кнопка будет неактивна.

Удалить все пики справа, Удалить все пики слева. После нажатия на одну из этих кнопок появляется вопрос – предупреждение: "Вы действительно хотите удалить все пики справа от пика № xx?". При положительном ответе пики остаются на хроматограмме, а удаляются их номера.

Расщепить – чтобы расщепить выбранный пик на два, нужно нажать кнопку "Расщепить", курсор изменит вид – станет тонкой вертикальной стрелкой. Далее следует привести курсор на то место, в котором требуется расщепить пик (это место обязательно должно быть в пределах границ пика) и один раз щёлкнуть левой кнопкой мыши. При расщеплении один пик оказывается расщеплённым на два, граница между ними проходит в месте расщепления. Программа сама выбирает расположение вершины нового пика. При необходимости её можно передвинуть. Если пик не выбран, данная кнопка будет неактивна.

Установить базовую линию – при нажатии на эту кнопку появляется меню, в котором можно выбрать тип базовой линии, который будет применен к выбранному пику:

Ортогональная – ортогональная базовая линия проводится между началом и окончанием выделенной области на хроматограмме параллельно оси времени (или объёма) удерживания из той граничной точки, которая расположена ниже по оси е.о.п. Из второй границы участка проводится перпендикуляр к базовой линии до пересечения с ней.

Долина к долине – в этом случае границы пика непосредственно соединяются базовой линией.

Если пик не выбран, данная кнопка будет неактивна.

Окончание редактирования разметки пиков

Кнопка "ОК" закрывает окно с сохранением внесённых изменений. Можно запустить расчет (или перерасчет) всех параметров хроматограммы для получения отчета с откорректированной разметкой.



Следует помнить, что измененная разметка действует ТОЛЬКО на данную сессию с данной хроматограммой.



Применить аналогичную разметку для другой хроматограммы – невозможно.

Разметку пиков можно выполнять поэтапно, т.е. многократно, до закрытия хроматограммы.

Чтобы иметь возможность произвести какие-либо расчеты или манипуляции с принятой разметкой данной хроматограммы в дальнейшем, необходимо ее сохранить через меню **Файл/ Сохранить хроматограмму как...** , и впоследствии продолжить обработку хроматограммы в модифицированном файле.

ЦЕЛЬ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Каждый хроматографический анализ планируется и осуществляется с одной из основных целей:

- ◆ задача *качественного анализа* – получение ответа на вопрос: "Какие компоненты присутствуют в анализируемом образце (пробе), каково их соотношение в относительных единицах?";
- ◆ задача *количественного анализа* - кроме ответа на первый вопрос подразумевает ответ на вопрос: "Каковы их концентрации в исследуемом образце?"

Ответ на вопрос: "С какой погрешностью и/или степенью достоверности мы можем ответить на два первых вопроса" – есть цель специальных экспериментов по определению метрологических и технических параметров (характеристик) хроматографа и хроматографической системы в целом, (т.е. хроматографической методики анализа).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПИКОВ

Однопараметрическая детекция

В хроматографии с однопараметрическим детектированием объем удерживания пика является единственным критерием для идентификации вещества в анализируемой смеси. Объем удерживания зависит от очень многих параметров: свойств сорбента, состава элюента, размера и качества колонки, температуры колонки и проч. Время удерживания дополнительно зависит от объемной скорости подачи насоса.

Разработанные и применяемые для идентификации методы реперных пиков, различных индексов облегчают решение проблемы, но не решают ее полностью. Использование же второго (или нескольких) дополнительных параметров детекции в качестве критериев, существенно повышают достоверность и надежность идентификации.

Самым простым методом создания **Таблицы компонентов**, содержащей объемы (или времена) удерживания и имена анализируемых компонентов, которая необходима для качественного анализа, является анализ растворов стандартных образцов индивидуальных веществ. Возможен иной подход: анализ нескольких смесей нескольких стандартов с постоянным качественным составом, но с переменной навеской того или иного вещества.

Количество факторов, влияющих на объем удерживания, при однопараметрической детекции вынуждает проводить калибровку едва ли не ежедневно.

Многоволновая детекция

Хроматограф "Милихром А-02" является хроматографом с многоволновым (многоканальным, многопараметрическим) детектором, поэтому при работе с ним для идентификации используются спектральные критерии, а объем удерживания используется только как первичный грубый критерий.

Как известно, оптическая плотность A раствора в кювете спектрофотометра на длине волны λ (величина, измеряемая детектором хроматографа "Милихром А-02") согласно закону Бугера-Ламберта-Бера определяется соотношением:

$$A(\lambda) = \xi_{\lambda} * l * C \quad 1)$$

где ξ_{λ} – коэффициент экстинкции вещества на длине волны λ ,

l – длина оптического пути кюветы детектора,

C – концентрация вещества в растворе (в кювете детектора).

Таким образом, оптическая плотность образца прямо пропорциональна концентрации вещества в кювете.

Зависимость оптической плотности от длины волны $A(\lambda)$ называется спектром раствора вещества. Детектор хроматографа "Милихром А-02" измеряет ультрафиолетовый (УФ) спектр по дискретному набору длин волн (через 2 нм) с получением дискретных отсчетов – точки на графике на рисунке справа.

При прохождении хроматографической зоны вещества через кювету мы получаем сигнал оптической плотности A на длине волны детекции λ_i , зависящий от концентрации вещества и от времени, что и является хроматографическим пиком:

$$A_{\lambda_i}(t) = \xi_{\lambda_i} * l * C(t)$$

При $i > 1$ мы одновременно получаем семейство из i хроматограмм. Приведенный справа фрагмент хроматограммы при двух длинах волн наглядно это иллюстрирует, и одновременно показывает возможность идентификации веществ в смесях известного состава при известных (справочных) спектрах веществ.

Выбор двух или нескольких длин волн детекции в характерных точках спектров веществ делает их идентификацию простой, удобной и надежной.

Спектральные отношения

Если для двух длин волн λ_i и λ_0 мы определим величину R как

$$R_{\lambda_i} = A_{\lambda_i} / A_{\lambda_0}, \tag{3}$$

то из 2) получим

$$R_{\lambda_i} = \xi_{\lambda_i} / \xi_{\lambda_0}, \tag{4}$$

то есть, получим безразмерную величину, называемую *спектральным отношением*, не зависящую от концентрации, и являющуюся физической константой для данного вещества. Таких спектральных отношений может быть на одно меньше, чем количество длин волн, использованных для детекции⁷.

Понятно, что в промежутке между пиками спектральное отношение не определено. Степень постоянства текущих значений спектральных отношений по профилю пика несет информацию о спектральной гомогенности (однородности) пика.

Известно, что площадь пика является мерой количества вещества в пике (т.е. в пробе), а при делении площади пика на объем пробы – мерой концентрации. Не трудно показать, что спектральное отношение так же равно:

$$R_{\lambda_i} = S_{\lambda_i} / S_{\lambda_0} \tag{5}$$

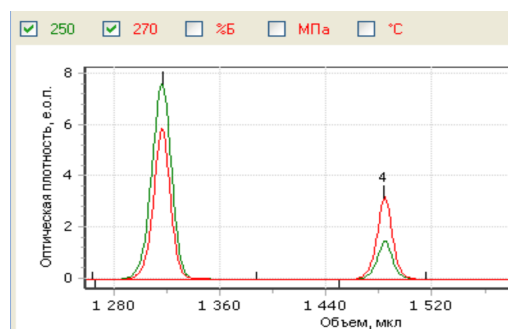
Таким образом, вычисляя площадь пиков на нескольких длинах волн детекции, а затем – их отношение, мы легко получаем спектральные отношения – простые и удобные критерии для идентификации пиков веществ, спектральные характеристики которых мы знаем⁸. Понятно, что наличие примеси (пика-наездника), или неполное разделение пиков, затруд-

$A(\lambda)$

λ

Пример. Уф-спектр раствора пирена.

2)



⁷ Формально, количество спектральных отношений равно числу длин волн, но одно отношение всегда и для всех веществ равно 1 (при $\lambda_i = \lambda_0$).

⁸ Спектры веществ, приводимые в справочниках, записываются в различных растворителях, при различных значениях pH, и могут отличаться от получаемых на хроматографе "Милихром А-02", поэтому идентификация по ним будет носить вероятностный и приблизительный характер.

няют идентификацию. Программа "АльфаХром" позволяет получать отчеты с расчетом полученных спектральных отношений, с помощью которых подтверждается первичная идентификация по объемам удерживания.

Представление спектральных отношений как координат вершины многомерного вектора (см. Приложение 2), выходящего из начала координат, дает простой и удобный способ сравнения спектров по углу между двумя векторами в n -мерном пространстве. Расчеты показывают, что семь спектральных отношений позволяют уверенно различать до $1 \cdot 10^9$ спектров. На этих представлениях базируется описываемая ниже База данных ВЭЖХ-УФ "БД-2003".

ГРАДУИРОВКА⁹ ХРОМАТОГРАФА

Хроматограф – это средство измерения с индивидуальной градуировкой, поэтому в хроматографии для решения первых двух задач анализу предшествует специальная процедура – *градуировка* по стандартным образцам веществ, предположительно содержащихся в анализируемой пробе.

Проведение *градуировки* преследует две цели: получить характеристику удерживания вещества на колонке при заданных хроматографических условиях¹⁰, и получить зависимость отклика детектора от содержания в пробе (*градуировку*) для каждого из интересующих компонентов. Результатом *градуировки* являются:

Таблица компонентов - содержит времена или объемы удерживания и имена анализируемых компонентов;

Таблица концентраций - зависимость "введенное количество вещества - отклик детектора", (дискретные значения);

Градуировочная кривая - зависимость "введенное количество вещества - отклик детектора", аппроксимированная какой-либо кривой.

Градуировка проводится путем анализа одной или нескольких смесей с известным качественным и количественным составом.

Определение концентраций компонентов в анализируемых образцах производится на основе полученных откликов детектора (площадей пиков) и градуировочных кривых. Вычисления, используемые для определения концентрации компонентов на базе градуировочной зависимости и отклика детектора, называются *Количественным расчетом*.

Градуировка является частью как МЕТОДА обработки, так и обработанной *хроматограммы*. Если градуировка включена в МЕТОД, для любой хроматограммы, полученной с его помощью, будет производиться идентификация компонентов и определение концентраций с использованием этой градуировки.



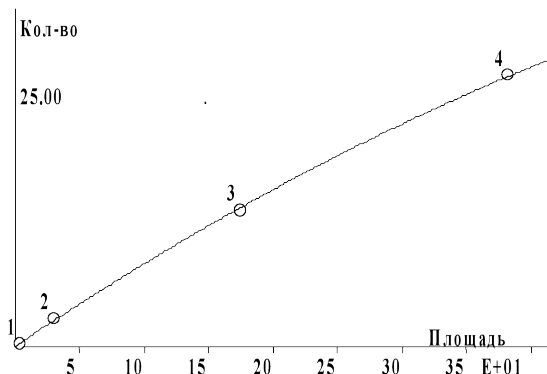
Правильное и тщательное проведение градуировки является необходимым условием точности получаемых количественных результатов анализа!

Любые изменения, внесенные в МЕТОД, в том числе, и изменение градуировки, не затрагивают хроматограммы, полученные этим методом ранее. Однако существует несколько способов применения обновленной градуировки к старым хроматограммам.

Методы градуировки

⁹ Вместо термина "градуировка" в литературе часто используется эквивалентный термин "калибровка". В настоящем Руководстве эти термины могут использоваться как синонимы.

¹⁰ Эта оговорка во многом определяет МЕТОД анализа. Строго говоря, градуировка, полученная при других условиях, хотя и подобных, - может оказаться неприменима.



Для построения зависимости между количеством компонента в пробе и откликом детектора (градуировочной зависимости) основными методами являются *абсолютная градуировка* и *метод внутреннего стандарта*. Эти методы отличаются по способу построения градуировочной зависимости.

В случае метода *абсолютной градуировки* просто строится градуировочная зависимость "площадь пика - количество компонента" во введенной пробе. Потери образца при пробоподготовке и ошибки при вводе пробы не учитываются. Это - основной, прямой способ построения градуировки.

В случае градуировки *методом внутреннего стандарта* в градуировочной смеси один из компонентов выбирается в качестве внутреннего стандарта. Концентрация компонента-стандарта в пробе должна быть точно известна. При построении градуировочных кривых это значение будет учитываться для корректировки площадей пиков всех компонентов. При этом компенсируются ошибки дозирования пробы и потери при пробоподготовке, а так же существенно улучшается воспроизводимость градуировочных точек. В принципе, любой компонент градуировочной смеси может быть объявлен внутренним стандартом.

Градуировочные точки

Одноточечная градуировка означает, что для градуировки компонента используется только одна градуировочная проба, на графике находится только одна точка, зависимость носит линейный характер и проходит через начало координат. Одноточечная градуировка является частным случаем многоточечной.

Многоточечная градуировка означает, что проводится несколько измерений для определения градуировочной зависимости, и на графике имеется несколько точек. В этом случае зависимость может быть аппроксимирована кривой любого, необязательно линейного, типа. *Методом наименьших квадратов* рассчитываются коэффициенты (градуировочные коэффициенты) кривой, наилучшим образом описывающей экспериментальные данные. Тип градуировочной кривой для расчета выбирается пользователем.

Градуировочные точки хранятся в *Таблице концентраций* (см. стр. 33), где строками являются названия компонентов, а столбцами - *градуировочные точки*. Каждая ячейка столбца хранит концентрацию компонента и площадь пика. Значения концентраций заполняются пользователем, все другие данные автоматически берутся из градуировочных хроматограмм.

МЕТОД ВНЕШНЕГО СТАНДАРТА (АБСОЛЮТНАЯ ГРАДУИРОВКА)

Метод внешнего стандарта (называемый также *Абсолютной градуировкой*) - это основной, базовый способ градуировки. Метод основан на построении зависимости количества (или концентрации) введенного в колонку компонента от площади пика, соответствующего этому компоненту. Обычно эта зависимость представляется как *градуировочный график*: по оси Y откладывается количество (или концентрация) введенного в пробу вещества, а по оси X - отклик детектора (площадь пика).

Количество введенного вещества Q_i вычисляется как произведение концентрации компонента (C_i) в градуировочной смеси на приведенный объем вводимой пробы (V'):

$$Q_i = C_i \cdot V' = C_i \cdot V \cdot A / D \quad 6)$$

где V - объем введенной пробы, D - разведение пробы, A - количество

Процедура построения зависимости количества вещества в пике от отклика детектора $W_i(R)$ может быть описана формулой:

$$W_i(R) = \text{RMS}(Q_{ij}, R_{ij}), \quad 7)$$

где RMS обозначает применение метода наименьших квадратов для вычисления

коэффициентов градуировочной зависимости, Q_{ij} - количество введенного i -го компонента, R_{ij} - отклик i -го компонента в j -й градуировочной хроматограмме.

Для расчета концентрации компонента используется формула

$$C_i = W_i(R_j) / V'. \quad 8)$$



Абсолютная градуировка может быть всегда пересчитана методом *Внутреннего стандарта*. При этом стандартным может быть выбран любой из компонентов градуировочной смеси с точно известной концентрацией.

МЕТОД ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА

Основной причиной ошибок определения концентрации компонента в пробе является вариация количества компонента, достигающего детектора, от одного измерения к другому. Это происходит из-за изменения объема пробы от ввода к вводу (даже в случае использования очень хорошего автосамплера), а также из-за различия потерь компонентов (или "приобретения") во время пробоподготовки и хроматографического разделения. На стадии получения градуировки эти причины приводят к дополнительным погрешностям (как случайным, так и систематическим) определения градуировочных коэффициентов.

Метод *Внутреннего стандарта* позволяет учесть упомянутые выше источники ошибок и увеличить точность и воспроизводимость результатов количественного анализа за счет привлечения дополнительной, априорной информации о концентрации и отклике детектора для одного из компонентов пробы, называемого *внутренним стандартом*. Эта информация может быть использована как на этапе градуировки (градуировка методом *Внутреннего стандарта*), так и на этапе расчета концентраций (расчет методом *Внутреннего стандарта*).

Градуировка методом внутреннего стандарта

Градуировочная кривая в методе внутреннего стандарта для всех компонентов создается так же, как и в методе *Внешнего стандарта*, но исходя из количества вещества, скорректированного с учетом заявленной концентрации стандартного компонента :

$$W_i(R) = RMS(Q'_{ij}, R_{ij}), \quad 9)$$

где $Q'_i = C_i * W_s(R_s) / C_s$,

При этом градуировку стандартного компонента обычно проводят с помощью набора тех же градуировочных смесей, что и для остальных компонентов. Получите градуировочные зависимости для всех компонентов методом *внешнего стандарта*. Затем выберите стандартный компонент и установите метод градуировки *Внутренний стандарт*. Программа произведет необходимые вычисления, все точки на градуировочном графике стандартного компонента визуально лягут точно на выбранный тип градуировочной кривой, а программа сможет выдать правильные абсолютные концентрации всех компонентов.



Использование метода внутреннего стандарта для градуировки существенно улучшает воспроизводимость анализа и точность получения *относительных коэффициентов отклика* компонентов. Погрешность расчета абсолютных концентраций в этом случае будет определяться, в первую очередь, погрешностью *градуировочной зависимости* стандартного компонента, полученной методом *абсолютной градуировки (внешнего стандарта)*.

Расчет методом внутреннего стандарта

Абсолютные градуировочные зависимости могут использоваться для расчета концентраций всеми доступными в программе "АльфаСпектр" методами расчета, в том числе и *методом внутреннего стандарта*.

В программе "АльфаСпектр" используется вариант метода внутреннего стандарта, отличающийся от "классического". Различие заключается в том, что вместо градуировочного графика в координатах $(C/C_{st}) - (R/R_{st})$ строится градуировочная зависимость, как в методе *Внешнего стандарта*. Это позволяет использовать метод *Внутреннего стандарта* без всяких ограничений, в том числе и в случае нелинейных градуировочных зависимостей. В случае же линейных градуировочных зависимостей оба варианта полностью идентичны.

При этом для расчета абсолютных концентраций компонентов необходимо знать абсолютную градуировочную зависимость для стандартного компонента.



Градуировочная зависимость стандартного компонента должна быть получена заранее, до проведения анализа исследуемой пробы, методом внешнего стандарта.

Вычисления выполняются в предположении, что точно известна концентрация стандартного компонента в растворе пробы C_s . Другая величина, известная из градуировочной кривой стандартного компонента - количество стандарта, достигшее детектора $Q_s = W_s(R_s)$.

Концентрация i -го компонента вычисляется по формуле:

$$C_i = C_s * W_i(R_i) / W_s(R_s). \quad (10)$$

Отсюда, если имеется абсолютная градуировочная зависимость $W_s(R_s)$ для стандартного компонента, можно вычислить абсолютные концентрации компонентов пробы.

Используя эти две величины, вычисляется эффективный объем введенной пробы.

$$V_e = W_s(R_s) / C_s, \quad (11)$$

Эта величина учитывает все ошибки определения объема вводимой пробы, потери образца во время пробоподготовки и т. д. и используется для построения градуировочных кривых других компонентов (исходя из предположения, что для всех компонентов пробы в данном анализе величина V_e одинакова):

$$Q'_{ij} = C_{ij} V_e = C_{ij} W_s(R_{sj}) / C_{sj} \quad (12)$$

Градуировочные кривые строятся, как и в методе *Внешнего стандарта*, но с учетом эффективного объема введенной пробы:

$$W_i(R) = RMS(Q'_{ij}, R_{ij}), \quad (13)$$

Если градуировочный график стандарта не известен, то принимается, что он носит линейный характер, проходит через начало координат и *Фактор отклика* для него равен единице. Это приводит к тому, что система ведет себя аналогично "классической" градуировке с помощью метода *Внутреннего стандарта* и рассчитывает относительные коэффициенты отклика детектора. Если зависимость линейна, этот подход обеспечивает получение правильных величин *Относительной концентрации, процентов Относительной концентрации и Нормализованной концентрации*.

Абсолютная концентрация в этом случае не имеет смысла и вычислена быть не может.

ПРОВЕДЕНИЕ ГРАДУИРОВКИ ХРОМАТОГРАФА

ВВЕДЕНИЕ В ПРОЦЕДУРУ ГРАДУИРОВКИ

Градуировка (*Калибровка*) - это процедура, необходимая для проведения анализа смеси неизвестного состава с целью качественного и количественного определения некоторых известных (предполагаемых) веществ. *Градуировка* проводится путем анализа одной или нескольких тестовых смесей с априорно известным качественным и количественным составом с целью определения *времен (объемов) удерживания* анализируемых компонентов и построения *градуировочных зависимостей*, связывающих *отклик детектора* (в нашем случае - *площадь пика*) и концентрацию для каждого компонента в пробе.



Для анализа абсолютно неизвестной смеси градуировать хроматограф невозможно.

Для тестовой смеси, используемой при градуировке, нужны априорные знания о порядке выхода компонентов смеси в данной хроматографической системе. Ниже описан процесс (процедура) градуировки с использованием тестовой смеси "Тест-3", прилагаемой к хроматографу (см. "Инструкция по поверке ЯПМИ 1544.2.0.0.00 И10"), для которой известен порядок выхода веществ на хроматограмме.

В программе "**АльфаСпектр**" результаты градуировки хранятся как в файле МЕТОДА обработки, так и в файле каждой хроматограммы. Все операции, связанные с качественным и количественным определением компонентов анализируемой смеси, сгруппированы в меню **Метод/ Компоненты и градуировка**.

ЭТАП 1. ПОЛУЧЕНИЕ ГРАДУИРОВОЧНЫХ ХРОМАТОГРАММ

Первая полученная градуировочная хроматограмма используется для создания *Таблицы компонентов* и заполнения первого столбца в *Таблице концентраций*.

Для получения хроматограмм:

Выполните все предварительные процедуры по подготовке хроматографа к проведению анализов в соответствии с руководством по эксплуатации (см. ТО и РЭ).

Возьмите тестовую смесь "Тест-3" (или приготовьте собственный градуировочный раствор или смесь веществ), с известной концентрацией определяемых веществ (вещества), залейте ее в пробирку, установите ее в автодозатор. Для получения *многоточечной калибровки* из исходной смеси сделайте несколько точных разведений¹¹, разлейте полученные растворы по пробиркам.

В управляющей программе "**АльфаХром**" через меню **Настройка/Настройки хроматографа** заполните паспорт колонки, установите требуемый режим работы хроматографа и детектора. Для того, чтобы хроматограммы после их получения оставались на экране, уберите флажок *Закрывать хроматограммы серии по завершении*. Через меню **Управление/Серия анализов**, задайте серию, заполните описание, задайте параметры работы насосов, детектора, термостата в соответствии с инструкцией по поверке или с МЕТОДОМ анализа, который предстоит откалибровать.

Сохраните набранную информацию в новом МЕТОДЕ анализа, например, *Калибр_0.mtd*. **Запустите серию анализов**.

По окончании серии анализов экспортируйте первую хроматограмму и перейдите в программу "**АльфаСпектр**", проверьте результаты разметки на пики. Если необходимо, внесите нужные изменения, как описано в гл. "Разметка хроматограммы на пики и интегрирование".


Сохраните обработанную хроматограмму, нажав пиктограмму

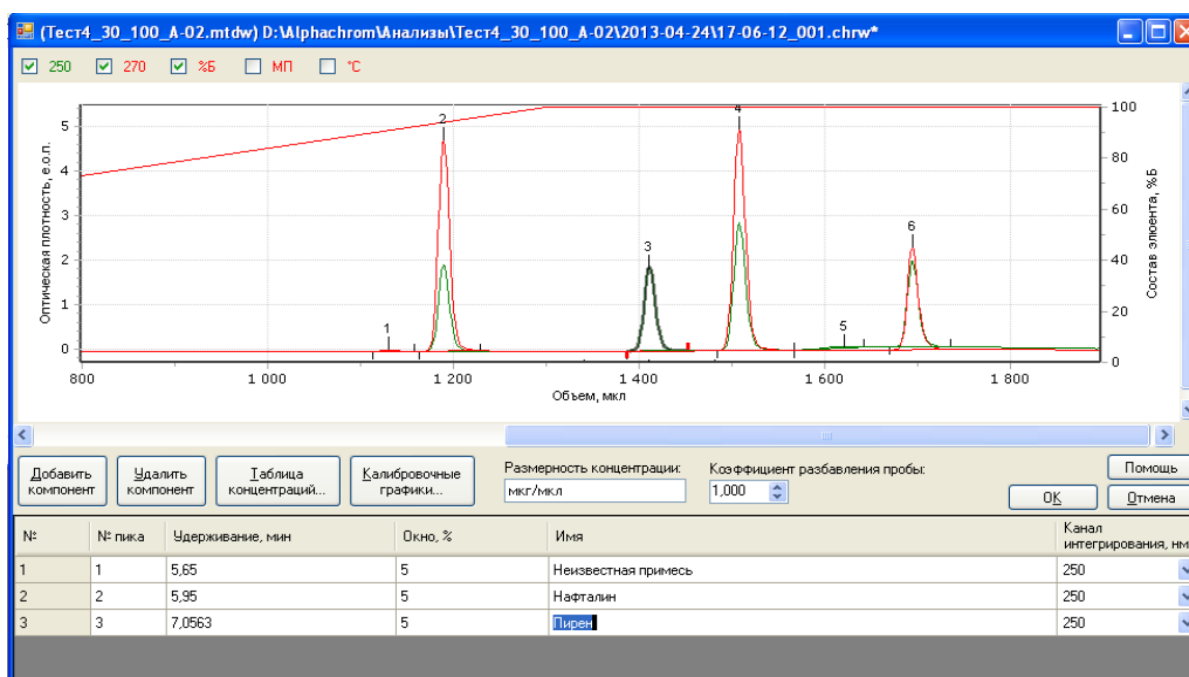
¹¹ Вполне допустимый вариант градуировки – дозирование увеличивающегося объема пробы, например: 2, 5 и 10 мкл. При этом необходимо следить, чтобы высота пика (пиков) на опорной длине волны не превышала диапазона линейности детектора.

ЭТАП 2. СОЗДАНИЕ ТАБЛИЦЫ КОМПОНЕНТОВ

Таблица компонентов содержит данные по анализируемым компонентам: имена и ожидаемые времена (объемы) удерживания, градуировочные коэффициенты, а также другую информацию, необходимую для идентификации компонентов и количественных расчетов.

Создание Таблицы компонентов является необходимым шагом как для проведения идентификации компонентов, так и для последующего получения градуировки и расчета концентраций компонентов в пробе. Таблица компонентов создается на базе градуировочной хроматограммы (хроматограммы смеси известного состава, с известной, как правило, концентрацией компонентов¹²).

Если Вы проводите процедуру градуировки не сразу после получения хроматограммы - откройте ее через меню **Файл/ Импортировать хроматограмму**. Если же вы перешли из "АльфаХром", экспортируя градуировочную хроматограмму, откройте таблицу компонентов, выбрав в главном меню пункт **Метод/ Компоненты и Градуировка**, или нажав пиктограмму  В нижней части окна хроматограммы появится панель таблицы компонентов и пустая таблица.



Каждая строка таблицы соответствует одному хроматографическому пику (компоненту). Добавить или удалить строку можно с помощью кнопок "Добавить компонент" или "Удалить компонент". При этом будет удалена та строка, на которой находится курсор.



Если курсор не установлен ни на одну из строк, то будет удалена первая строка.

Прежде всего, необходимо указать используемую размерность концентрации (мкг/мл, мг/мл, mM/L и т.д) и указать коэффициент разбавления пробы. Этот коэффициент показывает, во сколько раз была разбавлена проба перед хроматографией. При построении калибровочных графиков концентрации всех веществ берутся с учётом разбавления каждой пробы.

¹² Таблицу концентраций можно создать, зная только качественный состав смеси, не имея точных значений концентраций компонентов. В таком случае построение калибровочного графика и последующие вычисления будут производиться в относительных единицах.

Заполнение таблицы компонентов

Таблица включает в себя шесть столбцов:

№ - порядковый номер строки в таблице.

№ пика – номер пика на хроматограмме, которому соответствует данная строка в таблице. При добавлении новой строки в столбце *№ пика* по умолчанию стоит число 0. Это значит, что данная строка не соответствует ни одному пику. Чтобы установить соответствие строки и пика, необходимо вместо числа 0 ввести номер нужного пика.

Удерживание, мин – хроматографическое удерживание данного пика в минутах. Программа самостоятельно внесёт в таблицу информацию об удерживании пика, когда вы щелкнете по полю в заполняемой строке.

Окно, % - обозначает интервал, в рамках которого компонент будет идентифицироваться по удерживанию на следующих хроматограммах. Если удерживание пика компонента на следующей хроматограмме будет отличаться от его удерживания на текущей хроматограмме не более, чем на величину окна, то программа самостоятельно установит соответствие между пиком и компонентом из таблицы.

Имя – название компонента. Задаётся пользователем.

Канал интегрирования, нм – канал (длина волны), по которому будет вычисляться площадь пика. По умолчанию он совпадает с каналом разметки пиков. Можно для каждой строки таблицы (т.е. для каждого вещества) выбрать свой канал интегрирования из числа использованных при записи хроматограммы, например, выбрать длину волны вблизи максимума поглощения.



Вычисление площади пика будет проводиться в границах, определенных при разметке пика по опорной длине волны.



В случае применения различных каналов для разметки и интегрирования в отчете следует обязательно включить столбец "Канал интегрирования (λ)".

Закройте *Таблицу компонентов*, щелкнув по кнопке **ОК**. Можно отказаться от внесенных изменений, щелкнув по кнопке **Отмена**.

Запишите МЕТОД (**Метод/Сохранить метод**) и хроматограмму, нажав пиктограмму

Теперь Ваш МЕТОД позволяет проводить *идентификацию* компонентов по объемам (временам) удерживания и *расчет концентраций* простейшим методом - *Нормализация площадей*.

Кнопки **Таблица концентраций** и **Калибровочные графики** позволяют быстро переходить к следующим этапам градуировки, не выходя из *Таблицы компонентов*.

ЭТАП 3. СОЗДАНИЕ ТАБЛИЦЫ КОНЦЕНТРАЦИЙ

Создание таблицы концентраций, то есть, введение информации о количестве градуировочных смесей и концентрациях их компонентов, является основным шагом при проведении градуировки.



Таблица концентраций может создаваться только на основе ранее созданной Таблицы компонентов!

После создания таблицы компонентов нажмите кнопку **Таблица концентраций**. Откроется пустая таблица концентраций, т.е., таблица только с тремя светло-серыми столбцами и темно-серым полем справа (см. рисунок), которую необходимо заполнить.

Таблица концентраций заполняется только для градуировочных хроматограмм, и может

№	Имя	Эта хр-ма, мкл/г.о.п.	Точка 1, мкг/мкл	Точка 2, мкг/мкл	Точка 3, мкг/мкл
1	Неизвестная примесь	0,5765	0	0	0
2	Нафталин	27,5471	0,6	0,3	0,15
3	Пирен	27,281	1,0	0,5	0,25

быть создана только на основе ранее созданной *Таблицы компонентов*. В эту таблицу пользователь вводит данные, на основании которых строятся калибровочные графики, и проводится количественный анализ образцов.

Каждая строка в таблице соответствует одному компоненту из *Таблицы компонентов*. Если количество строк превышает 3, справа появляется полоса прокрутки.

Таблица концентраций может включать в себя разное количество столбцов, но три первых столбца в ней присутствуют обязательно:

№	- порядковый номер строки в таблице.
Имя	- имя компонента, которое пользователь указал в <i>Таблице компонентов</i> .
Эта хр-ма, мкл*е.о.п.	- площадь пика компонента <u>на данной хроматограмме</u> , вычисленная при данной разметке пиков, которому соответствует данная строка.



Площадь пика может измеряться в *мин*е.о.п* в зависимости от настройки осей хроматограммы, поэтому при количественном анализе надо следить за единообразием применяемых единиц измерения.

Информацию, содержащуюся в этих столбцах, пользователь редактировать не может. Каждый из последующих столбцов соответствует одной градуировочной хроматограмме и, соответственно, одной точке на градуировочном графике. В эти столбцы пользователь самостоятельно вводит значения концентраций каждого компонента из соответствующей градуировочной хроматограммы. Заголовок каждого из таких столбцов включает в себя номер точки, соответствующей данному столбцу, и размерность единиц концентрации, которая берётся из *Таблицы компонентов*.

С помощью кнопок "**Добавить точку**" и "**Удалить точку**" можно добавлять в таблицу или удалять из нее столбцы, соответствующие точкам на градуировочном графике.

Например, на рисунке показана таблица концентраций, соответствующая трем точкам на градуировочном графике. Концентрация измеряется в мкг/мкл. Каждая из градуировочных хроматограмм содержит два поименованных компонента – нафталин и пирен. ("Неизвестную примесь" следует исключить из таблицы компонентов и/или перенастроить параметры интегрирования.) Количество компонентов можно изменить, вернувшись к редактированию *Таблицы компонентов*.

Чтобы закрыть таблицу концентраций с сохранением изменений, нужно нажать кнопку "**ОК**".

Чтобы закрыть таблицу без сохранения изменений, нужно нажать кнопку "**Отмена**".

Заполнение таблицы концентраций

Таблица концентраций, так же, как и *Калибровочные графики*, относится к МЕТОДУ обработки, а не к отдельной хроматограмме, и включает в себя данные сразу из нескольких хроматограмм.

Заполнение таблицы концентраций следует проводить в следующем порядке:

1. Импортируйте в "**АльфаСпектр**" первую градуировочную хроматограмму. Разметка на пики произведется автоматически.
2. При необходимости произведите корректировку разметки на пики, варьируя параметры и события интегрирования, но не *Редактором пиков*. Сохраните МЕТОД.
3. Сохраните обработанную хроматограмму.
4. Заполните для импортированной хроматограммы *Таблицу компонентов*, укажите размерность концентрации и коэффициент разбавления пробы.

Примечание: п.п. 1 – 3 были проделаны на первом этапе).

5. Откройте *Таблицу концентраций*, добавьте точку (№ 1), и в появившемся столбце укажите концентрации, соответствующие каждому компоненту, известные по приго-

товлению градуировочного раствора или по паспорту тестовой смеси. Закройте таблицу нажатием кнопки "Ок".

6. Запишите добавленную точку в МЕТОД обработки, выбрав пункт меню **Метод/ Сохранить метод**.
7. Импортируйте следующую градуировочную хроматограмму и выполните все описанные выше действия, начиная с п. 2.

ЭТАП 4. ПОЛУЧЕНИЕ ГРАДУИРОВОЧНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

С методической точки зрения процесс градуировки представляет собой получение градуировочных хроматограмм, занесение данных (площадей пиков) в таблицу концентраций и построение зависимостей концентраций от отклика детектора (площади пика) – калибровочных графиков.

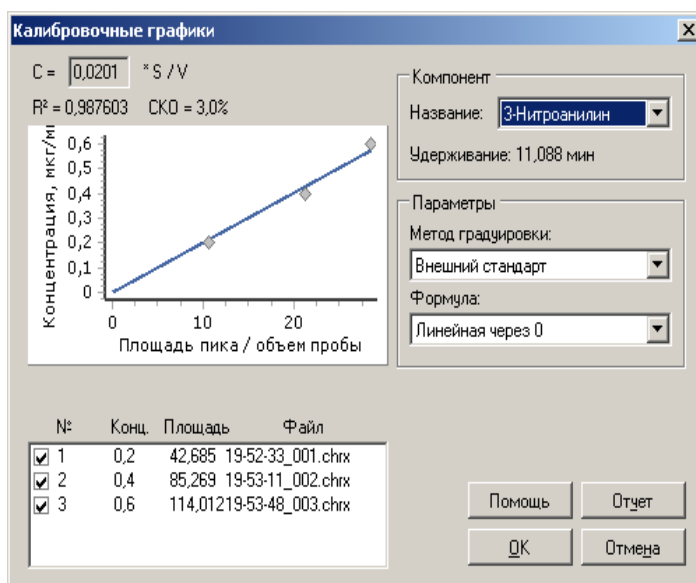
Калибровочные графики строятся на основе данных, полученных программой из градуировочных хроматограмм и введенных пользователем в *Таблицу компонентов* и в *Таблицу концентраций*.

Калибровочный график представляет собой график зависимости концентрации компонента в пробе от площади пика этого компонента, деленной на объем пробы. Концентрация измеряется в единицах, указанных пользователем в *Таблице компонентов*. Площади пиков вычисляются программой из градуировочных хроматограмм. Концентрации, соответствующие этим площадям, пользователь вводит в *Таблице концентраций*.

Вход в окно *Калибровочных графиков* производится из окна *Таблицы компонентов*.

В левой верхней части окна показывается уравнение калибровочной прямой (на рисунке: $C=0,0201 \cdot S/V$, где C – концентрация, S – площадь пика, V – объем пробы), коэффициент корреляции R^2 и среднее квадратическое отклонение СКО.

Каждая точка на калибровочном графике соответствует своей калибровочной хроматограмме. Параметры каждой точки показаны в таблице, расположенной ниже калибровочного графика. Каждая строка этой таблицы соответствует градуировочной точке. В столбцах показана следующая информация:



№ - порядковый номер строки.

Конц. – концентрация компонента, соответствующая данной точке, указанная пользователем в *Таблице концентраций*.

Площадь – площадь пика, соответствующая данной точке.

Файл – имя файла градуировочной хроматограммы, на основании которой была получена данная точка.

Пользователь может выбирать, учитывать точку на калибровочном графике или нет, поставив или убрав галочку в соответствующей строке таблицы. При многокомпонентной смеси это затрагивает график только выбранного компонента.

Вид градуировочного графика

В правой части окна графиков расположены два раздела, позволяющих пользователю настраивать вид градуировочного (калибровочного) графика:

Компонент. Калибровочный график строится для каждого компонента пробы, информация о котором введена в *Таблицу компонентов*, т.е., количество калибровочных графиков в МЕТОДЕ соответствует количеству компонентов. В окне калибровочных графиков отображается только один график, и в этом разделе пользователь может выбрать, какой из графиков показать на экране. Выбирается он из раскрывающегося списка "**Название**". Здесь же показано время удерживания выбранного компонента в минутах.

Параметры. Здесь из раскрывающегося списка пользователь может выбрать **метод градуировки** – внешний или внутренний стандарт.

Из списка под заголовком "**Формула**" выбирается один из трёх видов уравнений для аппроксимации градуировочной зависимости:

Линейная через 0: градуировочный график аппроксимируется прямой вида $y = a \cdot x$, проходящей через начало координат. Коэффициент a вычисляется автоматически.

Линейная: градуировочный график аппроксимируется уравнением прямой вида $y = a \cdot x + b$. Коэффициенты a и b вычисляются автоматически.

Пользовательские коэффициенты: градуировочный график аппроксимируется уравнением прямой вида $y = a \cdot x + b$. Коэффициенты a и b задаёт пользователь.

Сохранение градуировки. Использование градуировки

Таким образом, после получения градуировочных хроматограмм, их последовательного импорта, заполнения *Таблицы компонентов* и *Таблицы концентраций* с непременным нажатием кнопки "ОК", выбора и, при необходимости, корректировки *Калибровочного графика* с нажатием кнопки "ОК", параметры градуировки необходимо сохранить в МЕТОДЕ обработки через меню **МЕТОД/ Сохранить метод**. Информация, необходимая для идентификации и количественных расчетов, сохранится в МЕТОДЕ (в файле *Имя_метода.mtdw*).

Впоследствии, при выполнении анализа по МЕТОДУ анализа *Имя_метода.mtd*, для обработки результатов будет использована эта калибровка. Это не всегда удобно, особенно – при незначительной модификации аналитического метода.

Для того, чтобы можно было применить полученную калибровку для иного **МЕТОДА**, предусмотрена опция отдельного сохранения файла градуировки через меню **Метод/ Сохранить градуировку как...** с именем, например *Калибр_имя_метода.grdw*. Теперь для хроматограммы, полученной по методу *Имя_метода_2.mtd* можно воспользоваться опцией **Метод/ Применить градуировку...** и задать имя *Калибр_имя_метода.grdw*. Все параметры градуировки будут перенесены в новый МЕТОД. Если теперь сохранить МЕТОД обработки, он будет сохранен с новой градуировкой.

Отчет о градуировке

Пользователь имеет возможность сформировать и вывести на печать отчет о результатах градуировки. Для этого в окне *Калибровочных графиков* нужно нажать кнопку **Отчёт**. Отчёт формируется в отдельном окне и содержит информацию о результатах градуировки по каждому выбранному компоненту. Через меню **Файл/Печать** этого окна отчет о результатах градуировки может быть напечатан на принтере. Он же может быть скопирован в буфер (**Правка/Копировать в буфер**) или сохранен в файл в текстовом формате: **Файл/Сохранить как ...**

Результаты примененной градуировки могут быть включены в *Стандартный отчет* (см ниже.) по хроматограмме, если при *Настройке отчета* будет установлен флажок "Результаты градуировки".

НАЗНАЧЕНИЕ И ФОРМЫ ОТЧЕТОВ.


График полученной хроматограммы дает аналитику самое общее представление о компонентах пробы. Впрочем, опытный аналитик, выполняющий анализы, иногда может сделать определенные выводы (и ими удовлетвориться) только по внешнему виду хроматограммы.

Однако, основным документом о проведенном анализе и его результатах - это *Отчет*.

В программе "АльфаСпектр" предусмотрены процедуры выдачи отчетов, позволяющие вывести результаты выполненного анализа на экран, на принтер или в файл. Создание отчета является существенным этапом хроматографического анализа, так как после завершения хроматограммы автоматически производится только разметка на пики. Все остальные расчеты производятся только при создании отчета. Кроме того, в отчете сводится воедино вся информация о выполненном анализе, ранее представленная в различных окнах: сведения о пробе, параметры хроматографического процесса, сбора и обработки данных и т.п.

В программе "АльфаСпектр" предусмотрены так называемый *Стандартный отчет* и несколько специальных форм отчетов, см. разделы: Отчет о градуировке Отчет о поиске кандидата на идентификацию, Спектральный отчет при работе с Базой данных, Отчет по валидации методики и прибора при работе с Базой данных.

Форма стандартного отчета о выполненном анализе имеет гибкую систему настройки, и настраивается пользователем программы "АльфаСпектр".

Для настройки формы отчета через меню выберите команду **Метод/ Стандартный отчет** или нажмите кнопку . Откроется окно **Настройка отчета**. В этом окне пользователь выбирает из списка разделы, которые нужно включить в отчет.

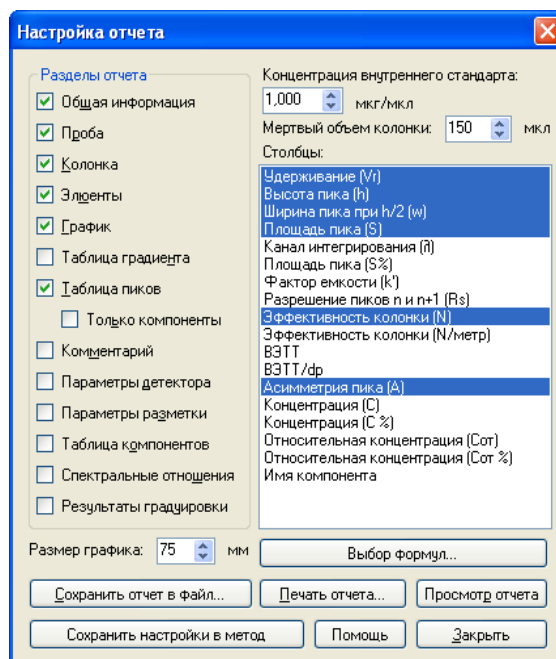
Стандартный отчет. Управление отчетом

Выбранные разделы включаются в отчет в том же порядке, в котором они перечислены в списке разделов в окне. Не выбранные разделы в отчет не войдут. Разделы содержат определенным образом сгруппированную информацию, и могут включаться или исключаться только целиком (см. ниже).

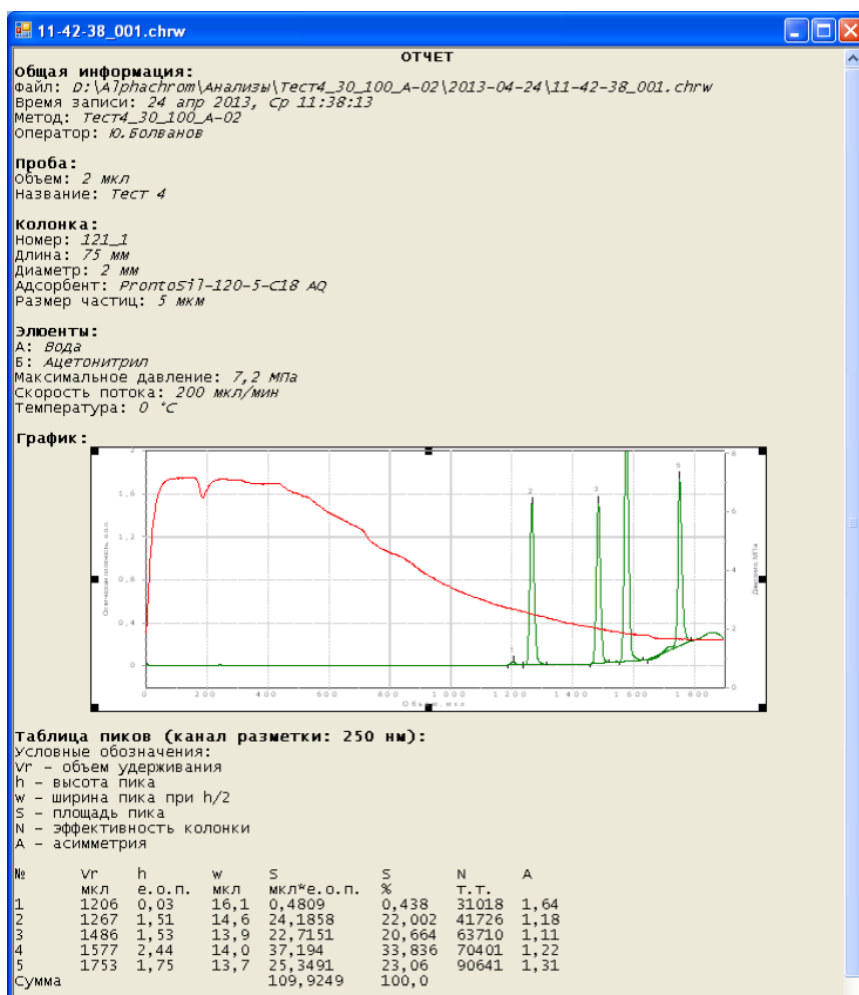
Строка "Размер графика xx мм" задает размер графика по вертикали, по ширине он печатается на всю страницу.

После задания всех параметров отчета его можно просмотреть – кнопка **Просмотр отчета** (см. пример на следующей странице), распечатать на принтере или сохранить в файле (кнопка **Сохранить отчет в файл ...**) и **Заккрыть**.

При необходимости, после просмотра отчета в его форму можно внести коррективы, вновь щелкнув мышью в поле окна **Настройка отчета** (в окне просмотра редактирование невозможно). После получения удовлетворительного результата отчет можно либо распечатать, либо оставить на экране для сравнения с результатами, полученными в других хроматограммах. Предварительно окно отчета можно уменьшить, оставив в нем только наиболее значимую часть. В процессе дальнейшей работы незакрытое окно просмотра отчета будет сохраняться на экране в свернутом виде с именем



файла хроматограммы . Свернутых окон отчетов может быть несколько, и впоследствии их можно просмотреть все одновременно. Для одновременного просмотра и сравнения нескольких отчетов, необходимо закрыть окно Настройки отчета.



При нажатии кнопки **Печать отчета...** открывается окно просмотра печатной формы отчета **Print preview**, в котором можно видеть, как будет выглядеть отчет на бумаге. В правом верхнем углу окна есть поле "Страница" ("Page"), показывающее, сколько страниц будет в отчете. Нажатие кнопки "Закреть" ("Close") прервет просмотр без печати, а после нажатия кнопки **Печать...** откроется стандартное окно выбора свойств принтера, из которого кнопкой "ОК" отчет можно напечатать.

Просмотр печатной формы делается в цвете, поэтому при печати на черно-белом принтере необходимо сделать пробную печать, т.к. некоторые цвета, например, желтый, будут практически не видны в черно-белом изображении. При неудовлетворительном результате печати надо вернуться к атрибутам линий, см. п. **Настройка атрибутов линий графика**



При этом надо помнить, что атрибуты линий действуют только на одну активную хроматограмму.

Когда все нужные разделы выбраны, сделан просмотр и пробная печать отчета, можно сохранить настройки отчёта в метод. Это осуществляется нажатием кнопки **Сохранить настройки в метод** в нижней части окна. После этого надо закрыть окно отчета и перезаписать метод **Метод/ Сохранить**. Тогда при последующих вызовах окна настройки отчёта в данном МЕТОДЕ все сохранённые настройки будут воспроизведены.

При **Сохранении отчета в файл** просмотренный отчет в ttf-формате записывается в файл с именем породившей его хроматограммы *Имя_хроматограммы.ttf* и в ту же папку.

РАЗДЕЛЫ ОТЧЕТА

Отчет включает в себя ряд разделов, выбор которых производит пользователь, устанавливая флажки около названий требуемых разделов. Разделы содержат информацию о собственно АНАЛИЗЕ, о результатах его обработки и справочную информацию, связанную с особенностями обработки данных программой "АльфаСпектр".

Справочная информация о МЕТОДАХ анализа и обработки

В группе разделов отчета приведена справочная информация о МЕТОДЕ анализа.

Общая информация – в этом разделе содержится информация о пути к файлу хроматограммы, времени и дате записи хроматограммы, названии МЕТОДА анализа, в условиях которого была записана данная хроматограмма, и имени оператора.

Проба – в этом разделе указаны объем и название пробы.

Колонка – содержит информацию о номере, длине и диаметре колонки, а также о марке и размере частиц адсорбента.

Элюенты – содержит информацию о названиях элюентов А и Б, максимальном давлении в жидкостной системе хроматографа во время записи хроматограммы, скорости потока и температуре колонки согласно МЕТОДУ анализа.



В эти разделы включается та и только та информация, которая была внесена в управляющей программе "АльфаХром" при получении хроматограммы.

График – если данный раздел выбран, в отчет будет помещено изображение хроматограммы с разметкой пиков в том же масштабе, с теми же настройками вида и атрибутами линий, которые установлены в окне хроматограммы на экране на момент формирования отчета.

Таблица градиента - в отчете в табличном виде будет приведена форма градиента, использованная в данном МЕТОДЕ анализа.

Таблица пиков (Только компоненты) – подробно см. ниже.

Комментарий – содержит комментарий к методу, в условиях которого была записана хроматограмма. Этот комментарий оператор вводит в специальном поле для комментария при формировании МЕТОДА анализа в программе "АльфаХром".

Параметры детектора – содержит информацию о параметрах детектора, относящихся к данной хроматограмме:

- метод измерения (однолучевой или двухлучевой);
- рабочая кювета (верхняя или нижняя);
- момент времени начала регистрации данных (до или после ввода пробы в колонку);
- уровень шума по всем каналам, которые были задействованы при записи хроматограммы (это результат первичной обработки хроматограммы).

В нижней части окна **Настройка отчета** представлены флажки, при активации которых в отчет включается справочная информация, связанная с процессом обработки данных по используемому МЕТОДУ обработки.

Параметры разметки – содержит информацию о параметрах разметки, примененных к данной хроматограмме. Эти параметры были установлены во время операции "Разметка хроматограммы на пики и интегрирование".

Таблица компонентов – в отчет будет помещена *Таблица компонентов*, сформированная при градуировке хроматографа (см. Этап 2. Создание таблицы компонентов).

Спектральные отношения – в этом разделе содержится информация о спектральных отношениях каждого пика относительно выбранного канала (опорной длины волны). Выбор опорного канала осуществляется в "*Параметрах разметки хроматограммы*". Информация представляется в виде таблицы. В первом столбце таблицы перечислены номера пиков на хроматограмме, каждый из последующих столбцов соответствует своему каналу (длине вол-

ны). Спектральные отношения, представленные в таблице, вычисляются как отношения площадей пика при разных длинах волн к площади пика при опорной длине волны.

Результаты градуировки – этот раздел содержит информацию о результатах градуировки по всем компонентам, записанную в текущий МЕТОД обработки. Этот раздел отчёта дублирует отчёт, вызываемый в окне "*Калибровочные графики*", а именно:

Наименование компонента.

Уравнение градуировочной прямой, коэффициент корреляции (R^2) и среднее квадратичное отклонение (СКО).

Калибровочный график.

Опорный канал (длина волны).

Таблицу, содержащую информацию о каждой точке калибровочного графика:

- номер точки;
- концентрацию компонента в градуировочном растворе, соответствующую данной точке (указывается пользователем в "Таблице концентраций");
- площадь пика компонента на градуировочной хроматограмме, соответствующей данной точке;
- объём пробы, введённой в колонку при получении соответствующей градуировочной хроматограммы;
- время выхода пика компонента на градуировочной хроматограмме, соответствующей данной точке.

Таблица пиков - результат обработки

Важным разделом отчета является *Таблица пиков*, содержащая результаты всех расчетов, которые выполняются программой на основе данных, полученных из хроматограммы, настроек параметров интегрирования и градуировки (при наличии таковой).

Для включения в отчет *Таблицы пиков* необходимо установить одноименный флажок окна **Настройка отчета**. Сначала следует выбрать, включать в таблицу информацию о всех пиках, присутствующих¹³ (размеченных) на данной хроматограмме, или только о тех, которые определены в *Таблице компонентов* (т.е., идентифицированных). Для этого нужно соответственно убрать или установить флажок "Только компоненты".

Если выбран раздел "Таблица пиков", пользователю необходимо также выбрать столбцы с информацией, которая войдет в эту таблицу пиков. Определяемые (вычисляемые) характеристики пиков перечислены в правой части окна в разделе "**Столбцы**". Добавление пункта из списка в таблицу осуществляется однократным щелчком левой кнопкой мыши по его названию, которое после этого подсвечивается синим. Исключение столбца из таблицы пиков делается повторным щелчком.

Пользователю предлагаются следующие столбцы для включения в таблицу пиков:

Удерживание (T_r или V_r) – время (объем) удерживания хроматографического пика в минутах или микролитрах.



В отчете будет использована та единица измерения, которая выбрана для оси X на хроматограмме.

Высота пика (h) – высота пика в е.о.п., соответствующая опорному каналу (опорной длине волны).

Ширина пика при $h/2(w)$ – ширина пика на половине его высоты в тех же единицах, что и удерживание.

¹³ Здесь и далее имеются в виду не абсолютно все пики, присутствующие на хроматограмме, часть которых могла быть исключена настройкой *Детектора пиков* (по площади, высоте), или механизмом *Событий интегрирования*, а только пронумерованные *Детектором пиков*, или включенные ручным *Редактором пиков*.

Площадь пика (S) – площадь пика в единицах "мин*е.о.п." или "мкл*е.о.п.", соответствующая опорному каналу. В последней строке таблицы "Сумма" приводится также суммарная площадь всех пиков, включенных в отчет на хроматограмме.

Канал интегрирования – по умолчанию канал интегрирования, по которому вычислена площадь пика, совпадает с опорным каналом для разметки пиков. Иногда бывает целесообразно для каждого вещества (пика) выбрать свой канал интегрирования из числа использованных при записи хроматограммы, например, выбрать длину волны вблизи максимума поглощения. См. *Заполнение таблицы компонентов*. Обычно используется вариант "По умолчанию" и *Канал интегрирования* не надо включать в отчет.

Площадь пика (S%) – относительная площадь¹⁴ пика в процентах относительно суммарной площади пиков хроматограммы, включенных в отчет (см. примечание на стр. 40.).

Фактор ёмкости (k') – фактор ёмкости (коэффициент удерживания) пика. Вычисляется по формуле $k' = (V_R - V_0)/V_0$, где V_R – объём удерживания пика, V_0 – мёртвый объём колонки. Если этот объём не задан в одноименной строке выше *Столбцов*, фактор ёмкости будет равен нулю.

Разрешение пиков n и n+1 (Rs) – разрешение пиков номер n и $n+1$ на хроматограмме. Формула для вычисления разрешения выбирается пользователем в окне "**Выбор формул**".

Эффективность колонки (N) – эффективность колонки, вычисляемая по пику из соответствующей строки таблицы. Формула для вычисления эффективности выбирается пользователем в окне "**Выбор формул**".

Эффективность колонки (N/метр) – удельная эффективность колонки (эффективность на единицу длины колонки), вычисляемая по пику из соответствующей строки таблицы. Вычисляется как N/L , где L – длина колонки в метрах. При включении этого столбца в таблицу требуется задание длины колонки в МЕТОДЕ анализа.

ВЭТТ – высота, эквивалентная теоретической тарелке. Вычисляется по формуле $ВЭТТ=L/N$, где L – длина колонки в метрах, N – эффективность колонки, вычисляемая по пику из соответствующей строки таблицы. Формула для вычисления эффективности выбирается пользователем в окне "**Выбор формул**". ВЭТТ является характеристикой эффективности разделения веществ на колонке. Чем меньше ВЭТТ, тем выше эффективность.

ВЭТТ/dp – приведённая ВЭТТ (ПВЭТТ). Вычисляется по формуле $ПВЭТТ = 1000*L/N*dp$, где L – длина колонки в метрах, N – эффективность колонки, вычисляемая по пику из соответствующей строки таблицы, dp – диаметр частиц сорбента, упакованного в колонку, в мкм. При включении этого столбца в таблицу требуется задание диаметра частиц в МЕТОДЕ анализа.

Асимметрия пика (A) – коэффициент асимметрии пика. Формула для вычисления асимметрии выбирается пользователем в окне "**Выбор формул**".

Концентрация (C) – абсолютная концентрация компонента, вычисленная программой из текущей хроматограммы (с учётом разбавления пробы) с использованием градуировочной зависимости. Единицы измерения концентрации и коэффициент разбавления пробы указываются пользователем в *Таблице компонентов*. Концентрация отлична от 0 только для *идентифицированных* (включенных в таблицу компонентов) пиков.

Концентрация (C%) – концентрация компонента, нормированная на суммарную концентрацию всех компонентов на хроматограмме в процентах. Вычисляется по формуле $C_n\% = 100*C_n/C_\Sigma$, где C_n – концентрация n-го компонента, C_Σ – суммарная концентрация всех компонентов.

¹⁴ В случае использования особого канала интегрирования для одного или нескольких пиков этот параметр теряет смысл.

Относительная концентрация (C_{om}) – концентрация, скорректированная относительно внутреннего стандарта в процентах. Вычисляется по формуле $C_{om} = \frac{Q_n}{Q_s} * C_s$, где Q_n и Q_s – количества соответственно n-го компонента и внутреннего стандарта, вычисляемые программой по градуировочным зависимостям, C_s – концентрация стандартного образца, введенная пользователем в *Таблице концентраций*.

Относительная концентрация ($C_{om}\%$) – концентрация компонента, нормированная на суммарную концентрацию всех компонентов на хроматограмме, за исключением внутреннего стандарта. Вычисляется по формуле $C_n\% = \frac{C_n}{C_\Sigma}$, где C_n – концентрация n-го компонента, C_Σ – суммарная концентрация всех компонентов, за исключением внутреннего стандарта.

Имя компонента – имя, указанное пользователем в *Таблице компонентов*.

Выбор формул расчетов

В теории и практике хроматографии термины "Эффективность колонки", "Разрешение" и "Асимметрия", которые характеризуют эффективность хроматографического разделения, разрешение между двумя соседними пиками и асимметрию пика, определяются различным способом:

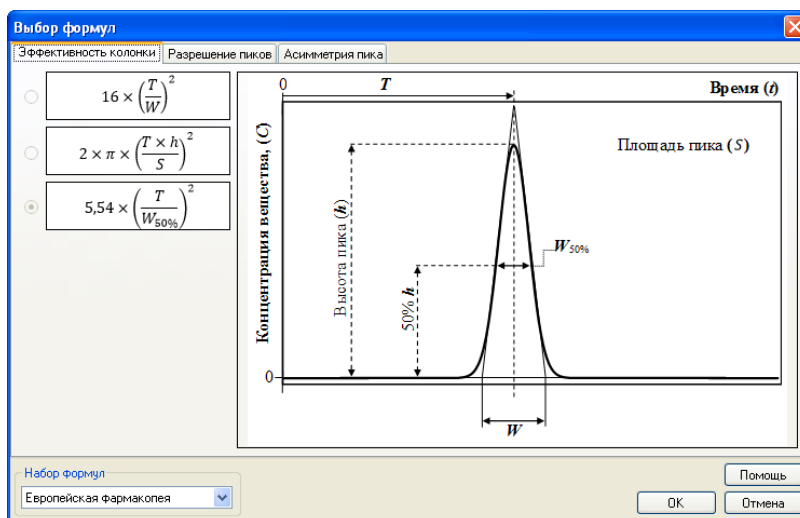
- по формулам европейской фармакопеи,
- по формулам фармакопеи США,
- по набору формул, устанавливаемому пользователем.

Выбор той или иной группы формул расчета осуществляется при настройке отчета нажатием на кнопку "**Выбор формул**", либо заранее в окне "**Выбор формул**", которое открывается через меню **Метод/ Формулы...** Пользователь выбирает набор формул, по которым программа будет вычислять заданные параметры из хроматограмм.

Если в выпадающем списке выбран *Набор формул* из фармакопей Европы или США, то поля *формул* недоступны для редактирования. Если выбран пользовательский набор, то в этих полях можно выбрать один из предлагаемых вариантов для расчёта соответствующих параметров.

Эффективность колонки

Эффективность колонки **N** характеризуется числом теоретических тарелок, вычисляемым по одной из формул, приведенных в соответствующей закладке окна **Выбор формул**.



Здесь: T – время (объем) удерживания пика, h – его амплитуда, W , a и b – полная ширина пика и ее частит на уровне базовой линии соответственно в тех же единицах, что и

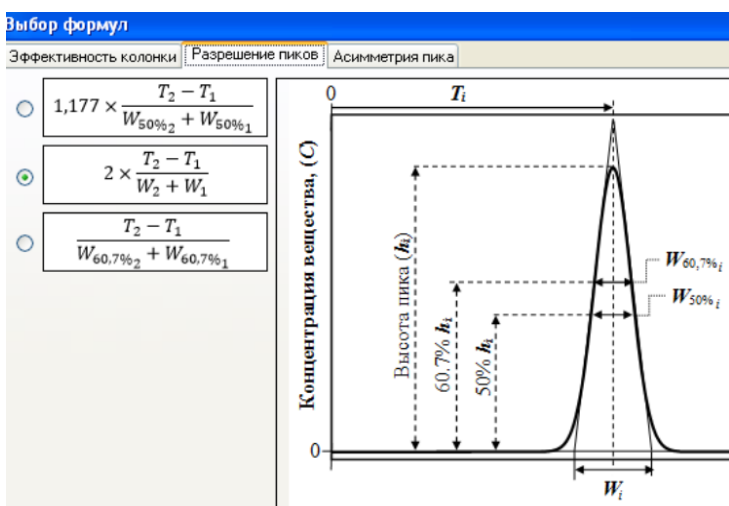
удерживание; S – площадь пика.

Все три формулы для отдельно стоящих пиков дают близкий результат. Для смежных (неразделенных) пиков результаты могут различаться, так как и площадь и ширина таких пиков измеряются с некоторой погрешностью.

Эффективность колонки не является константой, а сложным образом зависит от объема удерживания пика из-за влияния экстраколлоидного и диффузионного размывания пиков.

Строго говоря, для градиентной хроматографии понятие эффективности колонки не определено (в этом случае ее эффективность зависит от формы градиента и качества смесителя), однако иногда этот параметр полезно включать в отчет.

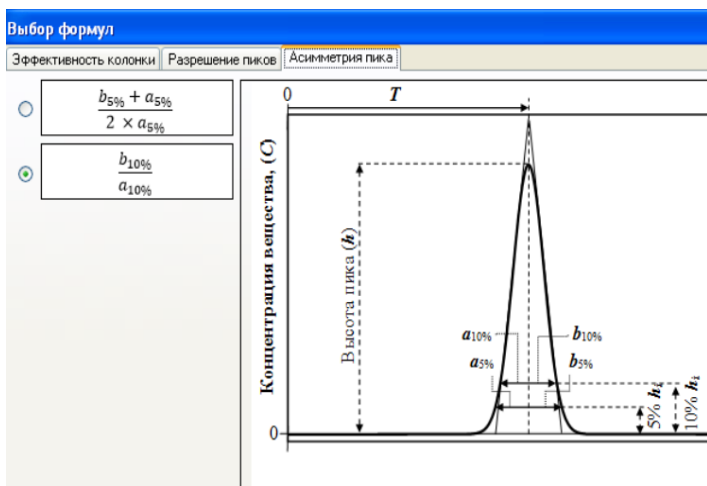
Разрешение пиков



Разрешение (коэффициент разделения) соседних пиков R_i , так же вычисляется по одной из трех формул, приведенных в соответствующей закладке окна **Выбор формул**.

Здесь T_i и T_{i+1} – времена (или объемы V_i V_{i+1}) удерживания пика; $W_{50\%}$, $W_{60,7\%}$ и W_i – ширина пика на полувысоте, на уровне 0.607 и на уровне базовой линии соответственно в тех же единицах, что и время; (i) и $(i+1)$ – номера соседних пиков, независимо от того, включен ли $(i+1)$ -й пик в таблицу.

Асимметрия пиков



Асимметрия вычисляется на уровне 5% или 10% от высоты пика как отношение ширины за вершиной пика (b) к ширине перед его вершиной (a)

$A_s = b_{10\%} / a_{10\%}$ - европейская фармакопея;

$A_s = (b_{5\%} + a_{5\%}) / (2a_{5\%})$ – фармакопея США.

Выражения дают близкий результат, и любое из них может быть использовано, если нет специальных требования какого-либо стандарта.

Нажатие на кнопку "ОК" закрывает окно с сохранением внесённых изменений, на "Отмену" - оставляет ранее заданный набор без изменений.

УНИФИЦИРОВАННАЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА И БД

Для хроматографа "Милихром А-02" разработана унифицированная хроматографическая методика, которая позволяет автоматически проводить качественное и количественное определение УФ-поглощающих лекарственных, ядовитых, сильнодействующих, наркотических, взрывчатых, токсичных и других веществ без перенастройки хроматографа для анализа разных групп веществ. По этой методике:

- идентификация веществ проводится по временам (объемам) удерживания и по спектральным характеристикам, содержащимся в Базе данных "ВЭЖХ-УФ";
- при количественных расчетах НЕ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ стандартные образцы¹⁵ веществ;
- База данных содержит более 500 веществ и может пополняться пользователем (см. Внесение вещества в Базу данных, стр. 53);
- время анализа – около 50 минут;
- валидация (контроль) метода проводится по аттестованной смеси;
- методики формирования и использования Базы данных зарегистрированы в Федеральном реестре методик выполнения измерений,¹⁶ применяемых в сферах распространения государственного метрологического контроля и надзора (ФР.1.31.2003.00951, ФР.1.31.2003.00950, ФР.1.31.2006.02.966)

База данных постоянно пополняется, и может быть расширена до нескольких тысяч веществ (при наличии стандартных веществ). Время, необходимое для ввода в базу данных нового вещества, составляет примерно 3 часа.

Прилагаемая к хроматографу база данных "ВЭЖХ-УФ" в настоящее время содержит информацию о 500 веществах. Список веществ приведен на сайте ЗАО "ЭкоНова" <http://econova.ru/applications/publication/publication.php?set=atttechnique&id=>.

Для реализации методики необходимы специальная колонка, элюент и тестовая смесь. Набор расходных материалов на 1000 определений может входить в комплект поставки¹⁷. Тексты утвержденных методик входят в комплект поставки, а МЕТОД анализа и МЕТОД обработки входят в комплект поставки пакета ПО "АльфаХром" и "АльфаСпектр" – файлы *DB_2003.mtd*, *DB_2003.mtdw*.

Методы валидации *A02valid.mtd* и *A02valid.mtdw* так же входят в комплект ПО и описаны ниже.

Методы анализа, обработки данных и валидации БД-2003

Унифицированная методика базируется на хроматографировании исследуемого вещества на хроматографе "Милихром А-02" в градиентном режиме с обращенно-фазовым сорбентом в фиксированных условиях с детектированием на 8 длинах волн (210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм). В качестве элюента А используется раствор перхлората лития (в виде концентрата поставляется с БД-2003), элюент Б – ацетонитрил, скорость подачи элюента – 100 мкл/мин.

Идентификация веществ осуществляется по объемам удерживания (V_r) и по семи спектральным отношениям ($R = S_\lambda / S_{210}$) (см. стр. 26), содержащимся в базе данных. Оценка гомогенности хроматографического пика и работа **Мастера распознавания** производятся по так называемому *Спектральному углу* между многомерными векторами, координаты

¹⁵ Стандарты были использованы при создании Базы данных, по ним был градуирован МЕТОД.

¹⁶ Здесь они именуется: "Методика БД-2003" или кратко: "БД-2003".

¹⁷ Набор расходных материалов и компьютерная База данных "БД-2003" поставляются по отдельному заказу.

которых соответствуют спектральным отношениям определяемого вещества и вещества – кандидата (см. Приложение 1).

Вещество считается идентифицированным, если выполняется условие: $\varphi \leq 2,4$, где φ - значение угла между спектром анализируемого вещества и спектром вещества, найденного в базе данных в градусах.

Если значение угла φ находится в интервале $2,4 < \varphi < 4,0$ градусов, то идентификация признается неоднозначной, и оператор принимает решение о возможном присутствии данного компонента в исследуемом образце на основании дополнительных исследований.

Если значение угла $\varphi \geq 4,0$ градусов, идентификация признается отрицательной.

Валидация МЕТОДА и выполнение анализов

Подготовка хроматографа к работе с Базой данных БД-2003 и порядок работы по МЕТОДУ *DB_2003.mtd* соответствует обычным процедурам подготовки хроматографа. Но, прежде всего, до начала работы с БД необходимо проверить качество ацетонитрила, бидистиллированной воды и элюента А на пригодность для работы по МЕТОДУ БД-2003.



Все упомянутые процедуры подробно описаны в ТО и РЭ (гл. 6.2.1).

Валидация (т.е. подтверждение правильности работы) хроматографической системы и МЕТОДА производится по тем же основаниям, что и проверка элюентов, а так же – перед наиболее ответственными анализами

Валидация производится с помощью пятикомпонентной тестовой смеси "БД-2003", поставляемой с Базой данных. Качественный и количественный состав смеси приведен в ее паспорте. Порядок получения контрольной хроматограммы описан в ТО и РЭ (гл. 6.2.2). В паспорте на колонку приведена тестовая хроматограмма, полученная на ней при выпуске.

Отчет по валидации формируется только по хроматограмме, выполненной по МЕТОДУ *A02valid.mtd*. Метод обработки *A02valid.mtdw* вызывается автоматически при импорте хроматограммы, после чего **Отчет по валидации** формируется через меню **БД ВЭЖХ-УФ/Отчет по валидации**.



Отчет по валидации формируется только при стандартных параметрах интегрирования, т.е. все сделанные изменения разметки пиков сбрасываются на заводские. Это сделано для того, чтобы не было возможности "чуть-чуть откорректировать" результаты.

Сравнивая полученные в результате проверки данные с "правильными" данными из Методики БД-2003, можно сделать однозначный вывод о состоянии всех составляющих хроматографической системы. Компоненты раствора выбраны таким образом, что хроматографические и спектральные параметры каждого из них определенным и известным образом связаны с различными параметрами всей хроматографической системы.

Вид, содержание отчета и возможные выводы по результатам валидации описаны ниже. Контрольную хроматограмму можно обработать как и любую другую, в том числе – применить ручную разметку и получить **Стандартный отчет**.

Порядок работы при анализе произвольных образцов по МЕТОДУ *DB_2003.mtd* в целом такой же, как и при валидации. После выполнения всех процедур по подготовке прибора надо в окне анализа открыть метод *DB_2003.mtd*, убедиться, что все текущие установки хроматографа соответствуют требованиям МЕТОДА., подготовить образец(цы), заполнить таблицу автодозатора и запустить серию. Подробнее все это описано в ТО и РЭ.

ФОРМИРОВАНИЕ ОТЧЕТОВ ПРИ РАБОТЕ С БД-2003

Идентификация пиков

Хроматограммы, записанные в условиях МЕТОДА *DB-2003.mtd*, могут быть автоматически обработаны с использованием базы хроматографических и спектральных данных "БД-2003". В процессе обработки характеристики пиков, присутствующих на хроматограмме анализируемого образца, сравниваются с аналогичными характеристиками веществ из базы данных. На основании этого сравнения выявляются компоненты из Базы данных, присутствующие в пробе, и определяется качественный и количественный состав пробы по этим компонентам. Набор характеристик, входящих в состав Базы данных для каждого вещества, показан в гл. "Формирование Базы данных"

Качественная идентификация проводится по хроматографическому удерживанию вещества и по набору спектральных отношений R_x , рассчитанных при опорной длине волны 210 нм. Метод вычисления спектральных отношений выбирает пользователь

При идентификации хроматографического пика программа сначала отбирает из базы данных те вещества, которые подходят по времени (объему) удерживания – это вещества, время удерживания которых отличается от времени удерживания пика не более, чем на величину *окна по времени*. Величину этого окна устанавливает пользователь в пределах от 5 до 10 % от времени удерживания пика (допустимо от 0 до 100%). Остальные вещества в дальнейшем не рассматриваются. Затем программа сравнивает спектральные отношения рассматриваемого пика с эталонными спектральными отношениями веществ, отобранных по времени удерживания. При совпадении спектральных отношений происходит положительная идентификация вещества по спектру.

Спектральные отношения считаются совпадающими, если они различаются не более, чем на величину погрешности. Величины погрешностей для всех веществ базы данных приведены в окне "Формирование базы данных". В случае их совпадения идентификация по спектру считается положительной. В противном случае – отрицательной.

В случае положительной идентификации вещества по спектру программа вычисляет его концентрацию в пробе по следующему уравнению:

$$C = C_{эт} * \frac{S_x 210}{S_{y0} 210},$$

где S_{x210} – площадь пика определяемого вещества на хроматограмме при 210 нм, S_{y0210} – удельная площадь пика при 210 нм из БД-2003, $C_{эт}$ – эталонная концентрация вещества, соответствующая удельной площади его пика. Концентрация $C_{эт}$ для всех веществ из "БД-2003" – 1 мкг/мкл.

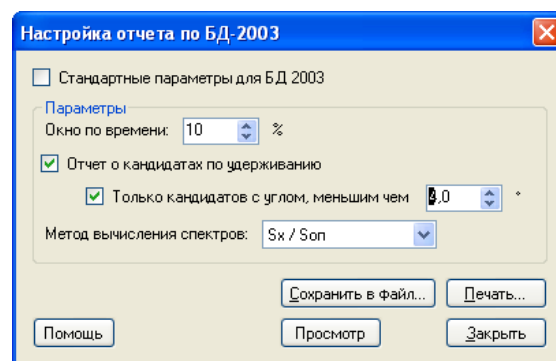
Настройка отчета по БД-2003

По результатам обработки хроматограммы с помощью базы данных "БД-2003" формируется *Отчёт по Базе данных БД-2003*. Чтобы настроить и сформировать такой отчёт нужно выбрать пункт меню **БД ВЭЖХ-УФ\ Отчет по Базе данных БД-2003**. Откроется окно "Настройка отчёта по БД-2003".

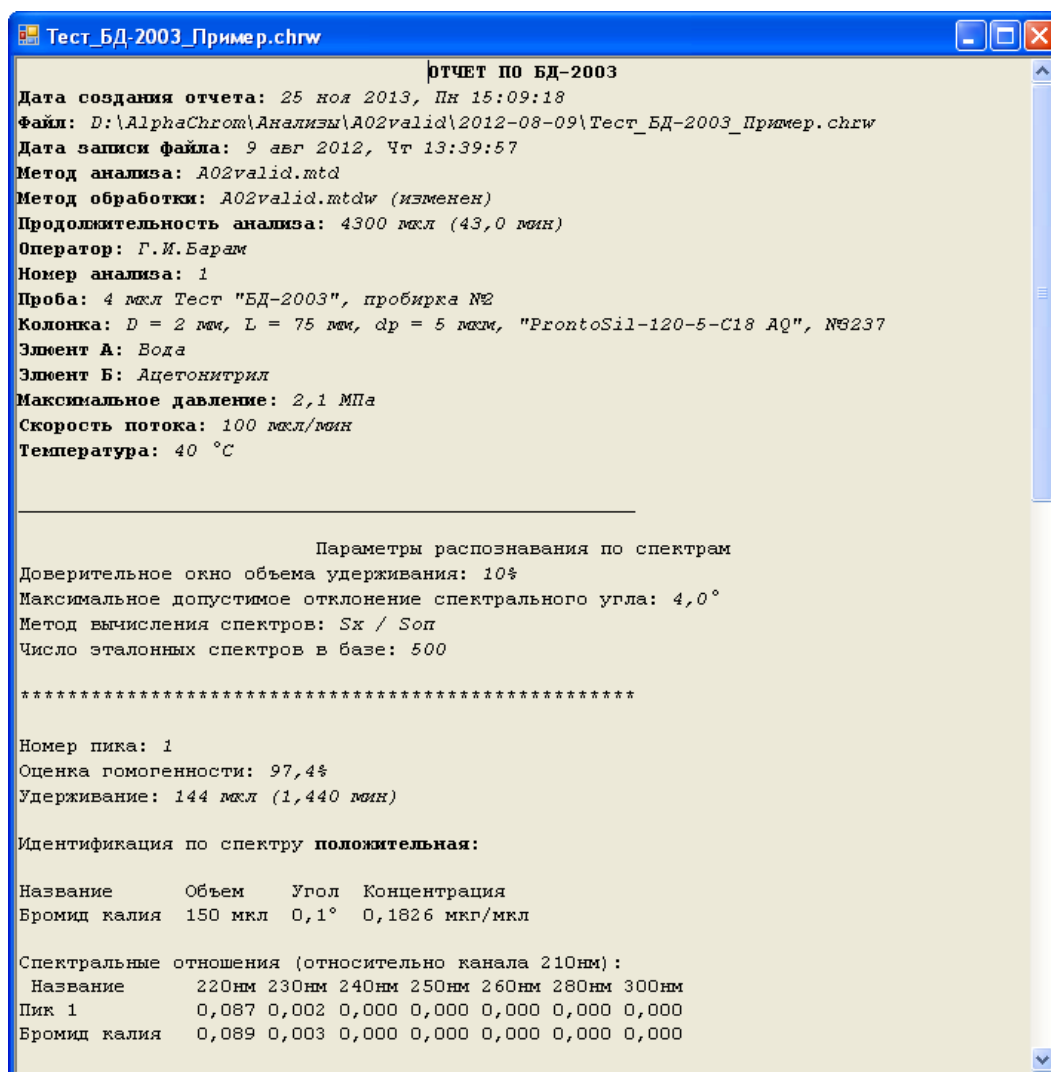
Стандартный отчет БД-2003

При установке флажка "Стандартные параметры для БД 2003" пользователь получит отчет по стандартной форме при фиксированных параметрах для БД-2003:

- окно по времени (удерживания) – 10%;
- отчёт о кандидатах по удерживанию – вкл.;
- метод вычисления спектров – $S_x/S_{от}$.



В этом случае редактирование параметров отчета отключено. Ниже приведён фрагмент отчёта, сформированного по хроматограмме тестовой смеси, записанной в условиях метода *DB-2003.mtd* с использованием стандартных параметров БД-2003.



Отчёт вызывается на экран нажатием кнопки "**Просмотр**" в нижней части окна настройки или выдается на печать кнопкой "**Печать...**".

Спектральный отчёт может быть сохранён в файл. Для этого нужно нажать кнопку "**Сохранить в файл...**" в нижней части окна. Файл отчёта сохраняется в формате *имя.rtf*. Имя файла пользователь задаёт самостоятельно. По умолчанию программа предлагает сохранить файл в той же папке, где находится файл хроматограммы.

Кнопка "**Заккрыть**" закрывает окно настройки отчёта.

Пользовательская форма отчёта по БД-2003

Чтобы включить возможность задания собственной формы спектрального отчета, нужно убрать флажок "**Стандартные параметры...**". Пользователь может включить и настроить следующие параметры **спектрального отчёта**.

Окно по времени, %: устанавливает величину окна по времени, в пределах которого вещества из базы данных будут считаться "подходящими" по времени (объему) удерживания. Параметр можно варьировать в пределах 0-100% от времени удерживания пика определяемого вещества. Рассматриваются только детектированные (т.е. пронумерованные) пики.

Отчёт о кандидатах по удерживанию: если выбрана эта опция, и НЕ АКТИВИРОВАН флажок "Только кандидатов с углом, меньшим чем...", то в спектральный отчёт по каждому пику будут включены вещества-кандидаты из базы данных, которые подходят по времени удерживания, без учета их спектральных отношений. В отчёте по каждому пику сначала приводится вещество, подходящее по спектру, с пометкой "идентификация по спектру положительная" затем – приводятся все другие вещества-кандидаты отдельным списком с указанием объема удерживания и спектрального угла.

Название	Объем	Угол	220nm	230nm	240nm	250nm	260nm	280nm	300nm
Пик 3	823 мкл		0,565	0,345	0,209	0,208	0,403	0,525	0,017
Кофеин	846 мкл	10,0°	0,419	0,233	0,140	0,138	0,273	0,365	0,012
Фамотицин	832 мкл	11,7°	0,703	0,418	0,286	0,342	0,483	0,329	0,018
Сиригин	806 мкл	25,2°	1,462	0,850	0,309	0,491	0,727	0,454	0,103
Гидроморфон	863 мкл	27,3°	0,400	0,279	0,119	0,047	0,030	0,053	0,012
Фосфэстрол	859 мкл	27,3°	0,665	0,623	0,656	0,577	0,393	0,121	0,009

Как правило, при 10 –процентном окне по времени, таких кандидатов будет очень много. Чтобы значительно уменьшить их количество, нужно активировать флажок "Только кандидатов с углом, меньшим чем" и выбрать угол. Таким образом в отчёт можно включить вещества, подходящие по времени, и только те из них, которые образуют с определяемым веществом спектральный угол меньше заданной величины, как на рисунке на стр. 47.

Идентификация по спектру положительна при величине спектрального угла меньше 2,4 градуса.

Метод вычисления спектров: предоставляется выбор одного из трёх методов вычисления спектральных отношений по пику определяемого вещества: S_x/S_{on} , (отношение площадей) "Лучший" спектр компонента и спектр в вершине пика (подробнее см. Параметры идентифицируемого пика ниже).

Количественное определение вещества в пике возможно только в том случае, когда выбран метод вычисления S_x/S_{on} в 2,4. Это ограничение связано с тем, что при использовании других методов велика вероятность получить неправильное значение концентрации. Дело в том, что методы "Лучший" спектр и A_{max} позволяют идентифицировать основное вещество в пике по спектру даже в случае присутствия в этом пике нескольких компонентов-примесей. Каждая примесь в пике вносит свой вклад в его площадь, а т.к. концентрация вещества в пробе рассчитывается по площади пика, результат может оказаться неверным.

При использовании метода вычисления спектра S_x/S_{on} идентификация пика возможна только в случае отсутствия в нем значимых примесей. В этом случае концентрация будет рассчитана верно.

Как видим, формы отчетов по БД детерминированы, но по хроматограмме, выполненной по МЕТОДУ DB-2003 можно получить такой же отчет, как и для любой другой, полученной по любому МЕТОДУ (см. гл. Отчеты).

ОТЧЕТ ПО ВАЛИДАЦИИ

Процедура проверки пригодности хроматографической системы и Метода включает запись тестовой хроматограммы с использованием МЕТОДА анализа *A02valid.mtd* и последующую ее автоматическую обработку. Для получения отчета по валидации необходимо:

- импортировать тестовую хроматограмму из программы "АльфаХром" или с диска в программу "АльфаСпектр"
- вызвать меню **БД ЖХ-УФ/Отчет по валидации**.

На экране появится Отчет по валидации, имеющий следующий вид:

Компонент	Пик	Параметр	Ожидаемое	+/-	Измерено	Годный
		Температура, °C	40,0	0,0	40,0	Да
		Поток, мкл/мин	100,0	0,0	100,0	Да
Бромид-ион	1	Удерживание, мкл	150	9	144	Да
Уридин	2	S(280)/S(250)	0,5	0,03	0,53	Нет
кофеин	3	S(260)/S(280)	0,76	0,04	0,73	Да
м-нитроанилин	4	S(260)/S(230)	0,6	0,02	0,61	Да
о-нитроанилин	5	Удерживание, мкл	1525,0	61,0	1542,3	Да
о-нитроанилин	5	Площадь, е.о.п.*мкл	24,8	0,99	25,58	Да
о-нитроанилин	5	Асимметрия	1,04	0,07	0,97	Да
о-нитроанилин	5	S(220)/S(210)	1,69	0,05	1,71	Да
о-нитроанилин	5	S(230)/S(210)	1,74	0,09	1,77	Да
о-нитроанилин	5	S(240)/S(210)	1,07	0,07	1,11	Да
о-нитроанилин	5	S(250)/S(210)	0,57	0,04	0,58	Да
о-нитроанилин	5	S(260)/S(210)	0,39	0,02	0,4	Да
о-нитроанилин	5	S(280)/S(210)	0,59	0,02	0,6	Да
о-нитроанилин	5	S(300)/S(210)	0,31	0,02	0,33	Да

В шапке отчета указаны имя файла, фактические параметры и режимы, при которых проводился эксперимент, дата его выполнения и дата обработки.

Назначение столбцов отчета по валидации

Компонент – наименование компонента тестовой смеси.

Пик – номер идентифицированного пика.

Параметр – наименование контролируемого параметра для данного пика.

Ожидаемое – среднее ожидаемое значение параметра.

+/- – допустимое отклонение значения.

Измерено – результат, полученный по данной хроматограмме.

Годный – результат сравнения полученного значения параметра с ожидаемым (требуемым) значением

Назначение строк отчета

Если значения всех измеренных параметров соответствуют ожидаемым в пределах допустимых погрешностей, то тест пройден, и хроматографическая система может использоваться для работы с Базой данных БД-2003.

Каждая строка отчета по валидации "отвечает" за свой параметр хроматографической системы – качество колонки, элюента, правильность спектральных характеристик детектора.

1. Строки *Температура*, и *Поток, мкл/мин* показывают фактическое значение этих параметров процесса. Если в этих строках есть отклонение - все результаты недействительны.

2. Строка: *Бромид-ион, Удерживание, мкл.* – бромид-ион – неударживаемый компонент контрольной смеси. Результат показывает свободный объем колонки, его несоответствие может говорить о том, что колонка "не та, что надо". Его возрастание может говорить о том, что сорбент в колонке просел, ресурс колонки близок к исчерпанию. Как правило, это сопровождается ростом асимметрии пика *о-нитроанилина* (см. п. 6).

3. Строки: *Уридин S(280)/S(250)*, *Кофеин S(260)/S(280)*, *м-Нитроанилин S(260)/S(230)* - показывают правильность (или неправильность) работы детектора в средней части диапазона (250 – 280 нм) длин волн детекции.

4. Строка: *о-Нитроанилин Удерживание, мкл* - свидетельствует о правильности работы смесителя градиентного насоса и корректности формирования градиента. Отклонение времени удерживания может говорить об изменении pH элюента А, об изменении начальной концентрации элюентов в сосудах А и Б, что может происходить при неаккуратном наливании элюентов или при некорректном (или недостаточном) выполнении процедуры смены растворителей.

5. Строка: *о-Нитроанилин 6 Площадь, е.о.п.*мкл* - говорит о правильности процесса дозирования пробы и правильности градуировки хроматографа. Несоответствие может говорить об засорении инъекционной иглы или порта инжектора

6. Строка: *о-Нитроанилин Асимметрия* - говорит о сохранении качества упаковки колонки, отклонения могут говорить об исчерпании ее ресурса.

7. Строки: *о-Нитроанилин S(220)/S(210) ... S(300)/S(210)* свидетельствуют о правильности (или неправильность) работы детектора во всем диапазоне длин волн детекции.

При отклонениях следует проверить шум и дрейф детектора и проверить ресурс работы дейтериевой лампы, после чего - обратиться к производителю хроматографа.

МАСТЕР РАСПОЗНАВАНИЯ

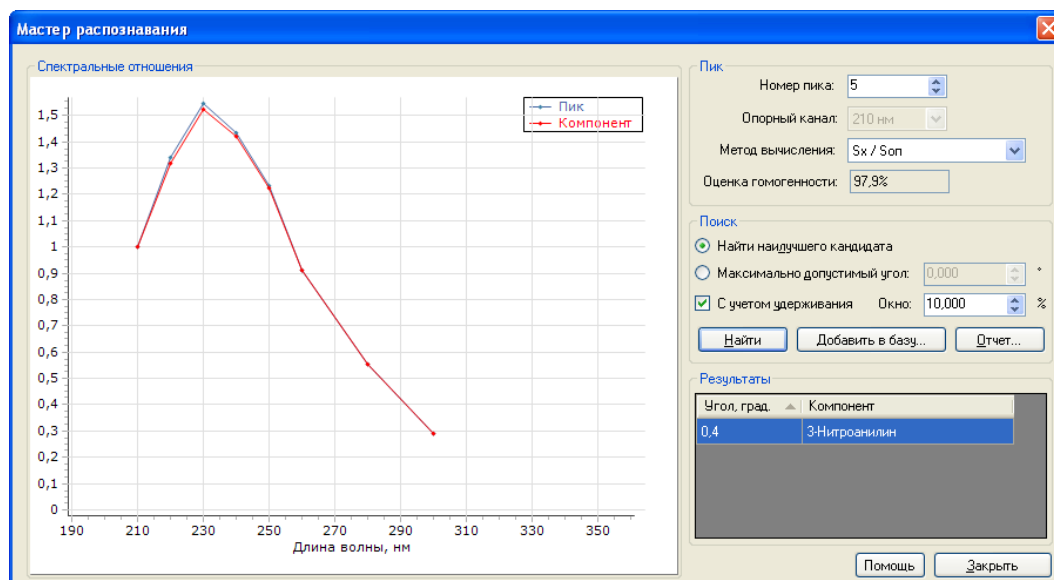
Инструмент "*Мастер распознавания*" служит для идентификации пиков на хроматограмме по их спектральным характеристикам в ручном режиме. Идентификация проводится путём сравнения спектральных отношений пика определяемого вещества со спектральными отношениями веществ, содержащихся в Базе данных "БД-2003" исходно, или занесенных в нее потребителем. Распознавание пиков ведется по активной хроматограмме с размеченными пиками.



Идентификация пиков с помощью *Мастера распознавания* применима только к хроматограммам, записанным при восьми длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм.

В базе данных "БД-2003" содержатся спектральные характеристики веществ, хроматографированных в условиях МЕТОДА *БД_2003.mtd*. При использовании Мастера распознавания для идентификации следует помнить, что УФ спектры веществ, хроматографированных в других условиях, могут отличаться от УФ спектров тех же веществ, записанных в базу данных "БД-2003".

Чтобы использовать мастер распознавания, следует выбрать пункт меню **БД ВЭЖХ-УФ/ Мастер распознавания**. Откроется окно Мастера:



Окно содержит четыре раздела:

Спектральные отношения – в этом разделе изображены УФ спектр идентифицируемого (определяемого) вещества в пике (синяя линия) и эталонный спектр из базы данных (красная линия), выбранный в разделе "**Результаты**" (см. ниже). Все спектры нормированы на оптическое поглощение, соответствующее опорной длине волны (для эталонных спектров БД-2003 это всегда 210 нм). Спектры строятся с использованием данных, полученных из хроматограмм по 8 точкам (каждая точка соответствует одной длине волны детектирования).

Параметры идентифицируемого пика

В разделе "**Пик**" задаются параметры пика определяемого вещества:

Номер пика – номер пика на хроматограмме, который будет идентифицирован с помощью мастера распознавания. Задается пользователем.

Опорный канал – в БД-2003 установлен опорный канал 210 нм, т.к. при создании базы данных именно этот канал использовался в качестве опорного. В данном случае – не редактируется.

Метод вычисления – в выпадающем списке выбирается один из трёх методов вычисления спектра по пику:

- S_x/S_{on} : вычисляется с учетом всех точек измерения в данном пике делением площади пика, соответствующей длине волны x на площадь пика, соответствующую опорной длине волны. Дает хороший результат для однородного (гомогенного) пика.
- "*Лучший спектр*" компонента вычисляется отдельно по каждой точке пика. В расчёт берётся только часть пика, на которой спектральные отношения постоянны. Данный метод может дать удовлетворительный результат даже при наличии неразделенной примеси в начале или в конце пика, если в рассматриваемом пике есть гомогенные участки.
- A_{max} – спектр в вершине пика. Вычисляется в точке, где сигнал детектора максимальный. Если высота пика не выходит за границу линейного диапазона детектора, этот спектр совпадает с "*лучшим спектром*".

Оценка гомогенности – показывает оценку однородности пика по составу. Оценка вычисляется по постоянству спектральных отношений по профилю пика. Это поле носит информационный характер и не подлежит изменению. Она может быть изменена при ручной разметке границ пиков и пересчете.

Поиск кандидата на идентификацию

Поиск – этот раздел служит для проведения поиска в базе данных веществ, схожих по хроматографическим и спектральным характеристикам с определяемым веществом. Критерии поиска – величина *спектрального угла* (см. **Приложение 2**) и близость (совпадение) хроматографического удерживания. Численные значения этих критериев задаёт пользователь.

Поиск по спектральному углу

Переключатель позволяет пользователю выбрать один из двух вариантов поиска по спектральному углу:

- *Найти наилучшего кандидата* – из множества веществ Базы данных будет выбрано одно вещество с наименьшим спектральным углом относительно определяемого вещества.
- *Максимально допустимый угол* – из множества веществ базы данных будут выбраны все вещества со спектральным углом меньше заданной величины относительно определяемого вещества.

Поиск по хроматографическому удерживанию

Для поиска веществ в Базе данных с учётом удерживания пользователь должен задействовать дополнительный параметр поиска.

Если выбрана опция "С учётом удерживания", из базы данных будут отбираться только вещества-кандидаты, отличающиеся по удерживанию от определяемого не более, чем на величину, указанную в поле "Окно, %".

Если пункт "С учётом удерживания" не выбран, то отбор веществ-кандидатов будет осуществляться только по спектральному углу, независимо от их хроматографического удерживания, как описано выше.

Чтобы выполнить поиск по заданным критериям, нужно нажать кнопку "Найти".

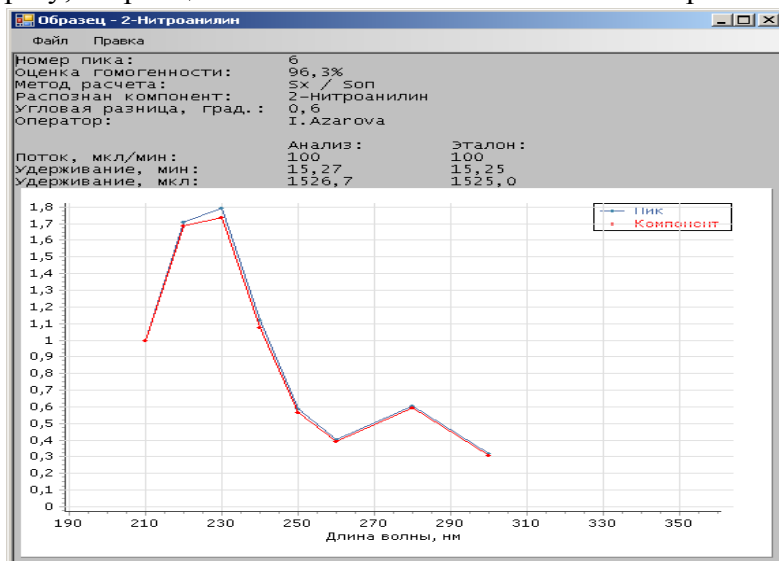
Результаты поиска. Отчет о поиске

Результаты поиска веществ в базе данных по заданным критериям отображаются в поле "**Результаты**" в виде таблицы. Каждая строка таблицы соответствует одному веществу-кандидату (компоненту). В левом столбце показан *спектральный угол* относительно определяемого вещества; в правом столбце указано название компонента из Базы данных.

Пользователь имеет возможность визуально сравнить спектры определяемого вещества и какого-либо из компонентов базы данных, представленных в результатах поиска. Для этого необходимо щёлкнуть левой кнопкой мыши в нужной строке таблицы результатов поиска. Строка будет выделена синим цветом, а в поле "Спектральные отношения" красной линией будет прорисован спектр выбранного компонента. Для единственного вещества-кандидата его спектр будет представлен сразу, и при щелчках мыши по названию ничего происходить не будет.

После проведения поиска пользователь может сформировать отчёт, в котором будет приведена сравнительная характеристика анализируемого вещества и одного из веществ-кандидатов, выбранных из результатов поиска. Для получения отчёта нужно нажать кнопку "Отчёт...". Пример такого отчёта показан на рисунке.

Отчет о поиске можно сохранить в файл или напечатать через меню **Файл/Сохранить как...** или **Файл/Печать...**

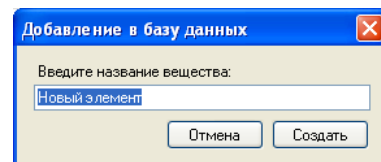


Внесение вещества в Базу данных

В программе предусмотрена возможность добавления новых веществ в компьютерную Базу данных. Чтобы вещество могло быть введено в базу, должны быть выполнены два условия:

- в качестве вещества должен выступать стандартный образец этого вещества, охарактеризованный по содержанию основного вещества;
- хроматограмма вещества записана в условиях МЕТОДА "DB_2003.mtd".

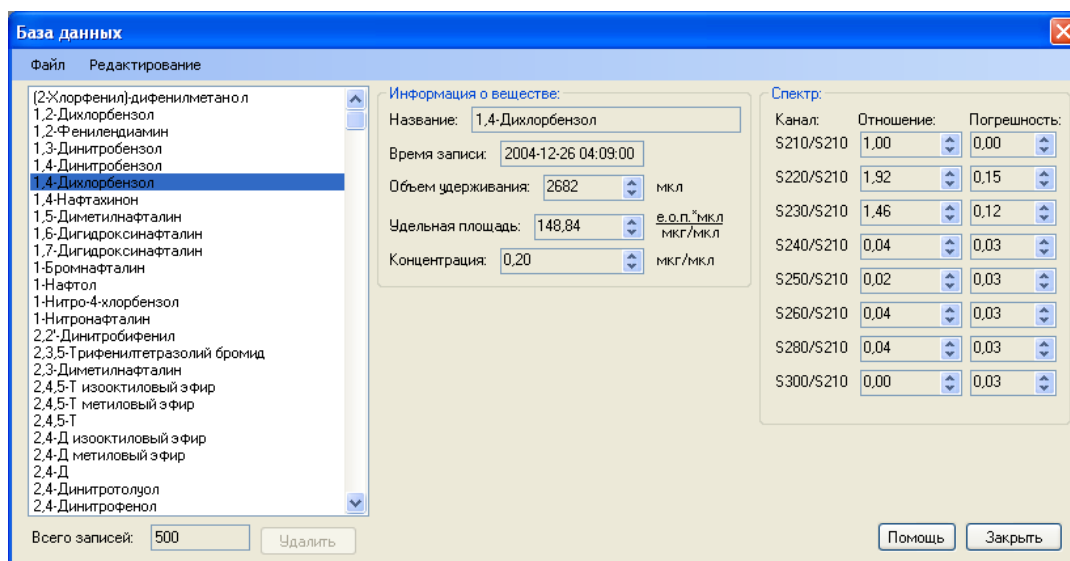
Если эти условия выполнены, то вещество может быть введено в базу данных. Для этого в окне *Мастера распознавания* необходимо нажать кнопку "Добавить в базу", и в появившемся плавающем окне указать название вводимого вещества. При нажатии кнопки "Создать" вещество будет введено в базу данных под указанным названием. Посмотреть его спектральные и хроматографические характеристики можно в окне "База данных" (см. Пополнение Базы Данных, стр. 55).



ФОРМИРОВАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ

Окно "База данных" служит для просмотра и редактирования базы данных хроматографических и спектральных характеристик веществ "БД-2003".

Открыть данное окно можно, выбрав в главном меню пункт БД ВЭЖХ-УФ/Формирование базы данных.



В левой части окна расположен список веществ, входящих в базу данных. В правой части окна – информация о выбранном веществе и его спектральные характеристики. Чтобы выбрать вещество и увидеть его характеристики, нужно один раз щёлкнуть левой кнопкой мыши по его названию в списке. Строка с названием при этом будет выделена синим цветом.

Параметры веществ показаны в двух разделах:

Информация о веществе

В разделе **Информация о веществе** представлены следующие сведения:

1. *Название* – название вещества в базе данных.
2. *Время записи* – время, когда была записана хроматограмма этого вещества для внесения в базу данных в формате ГГГГ-ММ-ДД чч-мм-сс.
3. *Объём удерживания* – объём удерживания выбранного вещества в условиях МЕТОДА DB-2003.mtd в микролитрах.
4. *Удельная площадь* – площадь пика выбранного вещества, соответствующая введённой в колонку пробе стандарта этого вещества объемом 4 мкл с концентрацией 1 мкг/мкл.
5. *Концентрация* – концентрация вещества в образце при записи хроматограммы, которая была использована для ввода параметров вещества в базу данных.

Спектры (спектральные отношения) веществ.

В разделе **Спектр** показана таблица спектральных отношений выбранного вещества. Каждой строке таблицы соответствует одно спектральное отношение. Таблица состоит из трёх столбцов:

1. *Канал* – в этом столбце указано наименование спектральных отношений.
2. *Отношение* – величины спектральных отношений, вычисляемые как отношение площадей пика при разных длинах волн (S_x) к площади пика при длине волны 210 нм (S_x/S_{210}).
3. *Погрешность* – величина погрешности, в пределах которой при сравнении спектральных отношений могут считаться (примерно) одинаковыми.

Пополнение Базы Данных

База данных "БД-2003" включает в себя 500 веществ. Их названия расположены в списке в алфавитном порядке.



Информацию об этих веществах нельзя редактировать или удалять.

Пользователь имеет возможность добавлять в Базу данных новые вещества. Информацию, добавленную в Базу данных пользователем, можно редактировать или удалять по усмотрению пользователя.

Добавление новой записи в базу данных осуществляется из окна **Мастер распознавания**. Новые записи помещаются в конец списка веществ в окне **База данных** в порядке, соответствующем времени их ввода в базу данных. В левой нижней части окна показано общее количество записей (т.е. веществ) в базе.

Чтобы отредактировать введенную запись, нужно включить режим Редактирования. Для этого в меню окна **База данных** нужно выбрать пункт **Редактирование/ Режим редактирования**. Когда данный режим включен, пользователь может вносить изменения в характеристики выбранного вновь введенного вещества, указанные в разделах "Информация о веществе" и "Спектр".

Чтобы удалить запись о веществе из базы данных, необходимо в режиме Редактирования выбрать нужную запись и нажать кнопку "Удалить", расположенную в левой нижней части окна.



Характеристики исходных пятисот веществ из "БД-2003" не редактируются и не удаляются.

Импорт и экспорт баз данных

Пользователь имеет возможность импортировать в программу базы данных из файла и экспортировать базы данных в файл. Это делается из окна "**База данных**" с помощью меню **Файл/ Импорт** и **Файл / Экспорт** соответственно. Файл, в котором хранится база данных, имеет вид *имя_БД.spmw*. Исходная база данных "БД-2003" хранится по адресу *Alphachrom/ Database* в файле *db2003.spmw*.

Эта опция позволяет обмениваться наработанными данными, внесенными в аналогичную базу данных различными пользователями. Вопрос правильности этих данных решается этими пользователями.

Приложения

1. Спектральный угол

Для исследования количественных характеристик спектров удобно воспользоваться их представлением в виде векторов. В случае двухканальной хроматограммы спектр представляется на плоскости в виде вектора, проекции которого на оси X и Y равны откликам детектора при длинах волн λ_1 и λ_2 соответственно. Мерой различия (или подобия) двух спектров может служить угол φ между их векторами, называемый **спектральным углом**.

Для многоканальной (многоволновой) хроматограммы спектр в любой ее точке является вектором абстрактного многомерного пространства, который не имеет столь простого наглядного представления. Однако угол между двумя n-мерными векторами (спектральный угол) можно использовать как меру различия двух спектров (при нулевом угле векторы, а, следовательно, и спектры совпадают).

Угол φ вычисляется по формуле:

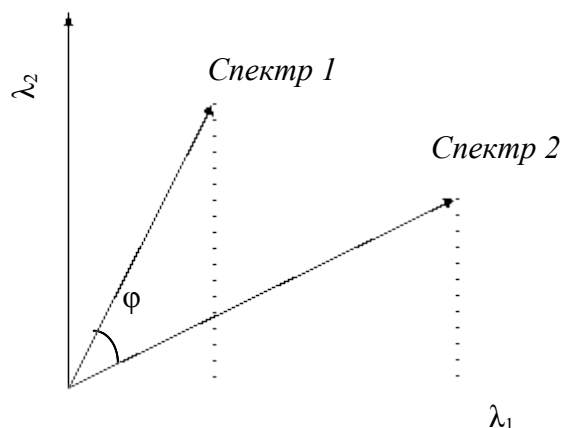
$$\cos \varphi = \frac{\bar{a} \cdot \bar{b}}{|\bar{a}| \cdot |\bar{b}|} \quad \text{или} \quad \cos \varphi = \frac{a_1 b_1 + a_2 b_2 + \dots + a_n b_n}{\sqrt{a_1^2 + a_2^2 + \dots + a_n^2} \cdot \sqrt{b_1^2 + b_2^2 + \dots + b_n^2}}$$

где a_i, b_i - одноименные координаты двух векторов. При сравнении спектров двух веществ a_i, b_i - суть оптическое поглощение на длине волны i .

При идентификации пика вещества в многоволновой хроматограмме под спектром \bar{a} , понимается спектр пика, вычисленный одним из трех способов (см. Параметры идентифицируемого пика, стр. 51), а под спектром b - эталонный спектр вещества-кандидата из базы данных.

Для однородного (гомогенного) хроматографического пика угол между спектрами соседних точек мало отличается от нуля (пропорционально величине шума). Если же пик неоднороден, этот угол заметно возрастает, достигая максимумов в областях максимального перекрытия неразделенных пиков и минимумов там, где существенно преобладает только один из компонентов.

По величине угла между спектрами в соседних точках пика можно достаточно надежно определить, является ли этот пик спектрально однородным или нет.



2. Алгоритм расчета шумов

В качестве величины, характеризующей уровень шума измерительного канала, обычно используют величину среднего квадратического отклонения от среднего значения измеряемого сигнала (СКО). Таким образом можно, например, измерить шум базовой линии в отсутствие хроматографических пиков.

В хроматографической практике также часто используют разность максимального и минимального значения (размах, peak-to-peak) шумового сигнала, удобную для оценки максимальной допустимой ошибки измерений. Для того чтобы оценить величину размаха по вычисленному значению СКО, ее следует умножить на 6 (такое соотношение справедливо, если шум канала близок к "белому").

При наличии хроматографических пиков формально рассчитанная величина СКО будет много больше величины шума из-за вклада измерений, соответствующих пикам. В программе "АльфаСпектр" используется специальная процедура измерения величины шума, позволяющая исключить пики. Она состоит в следующем.

Рассматриваются значения разности сигналов (приращение) для двух соседних точек хроматограммы. Если три идущие подряд приращения имеют один и тот же знак, это считается признаком того, что точки находятся на склоне пика. Такие точки из дальнейшего рассмотрения исключаются. Далее рассчитывается СКО для оставшихся точек. Поскольку в их числе могут оказаться точки, относящиеся к плоским вершинам пиков, а также случайные одно- или двухточечные выбросы большой амплитуды, далее исключаются все точки, отклонение которых от среднего значения превышает 5-кратную величину СКО. Процедура вычисления СКО и отбраковки выпадающих точек повторяется до тех пор, пока число точек не перестает уменьшаться.

Измеренная с использованием описанной процедуры величина шума для сигнала без пиков мало отличается от рассчитанной для него величины СКО.