МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

"НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет естественных наук
Кафедра аналитической химии

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ
ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ ОПТИМИЗАЦИИ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ

Сидорова Христина Николаевна

Научный руководитель
д.х.н., Барам Григорий Иосифович

Новосибирск – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ 4

1. ВВЕДЕНИЕ 5

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Характеристика метода ВЭЖХ 6

2.2. Зависимость фактора удерживания от состава бинарной подвижной фазы 7

2.3. Нахождение констант k'_0 и n 7

2.4. Зависимость фактора удерживания вещества от температуры 8

2.5. Влияние значения pH подвижной фазы на удерживание веществ 9

2.6. Вычисление объема удерживания вещества 10

2.7. Вычисление параметров хроматографического пика 11

2.8. Скорость потока подвижной фазы. Уравнение Ван-Деемтера 12

2.9. Оптимизация разделения в обращенно-фазовой жидкостной хроматографии 14

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Оборудование 16

3.2. Математическое обеспечение 16

3.3. Материалы 16

3.4. Приготовление исходных растворов 17

3.5. Модификация градиентного насоса хроматографа "Милихром-А02" 18

3.6. Определение объема смесителя 18

3.7. Определение объема задержки градиента 19

3.8. Определение величины внеколоночного уширения пиков 20

3.9. Хроматографические процедуры 20

3.10. Подготовка образцов для ВЭЖХ анализа 20

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Модификация смесителя в градиентном насосе 21

4.2. Определение величины внеколоночного уширения пиков 23

4.3. Вычисление объемов удерживания веществ при градиентном элюировании 25

4.4. Влияние температуры колонки на удерживание веществ в ОФ ВЭЖХ 28

4.5. Влияние скорости потока элюента на ширину хроматографического пика 31

4.6. Оптимальный метод определения констант, необходимых для эмулирования хроматограмм 32

4.7. Апробация разработанного метода нахождения констант для эмулирования хроматограмм 33

4.7.1. Определение констант для веществ, входящих в состав компьютерного тренажера "Жидкостный хроматограф". 33

4.7.2. Методика определения диэфиров фталевой кислоты 34

4.7.3. Методика определения вещества "Аналит" в водном экстракте коры осины 36
4.7.4. Методика определения состава лекарственного средства "Цитрамон-П" 37
5. ВЫВОДЫ 39
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 40
Приложение 1 43
Приложение 2 46

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

c – объёмная доля органического растворителя в подвижной фазе, %

$c_{вых}$ – объёмная доля органического растворителя в подвижной фазе, при которой вещество выходит из колонки, %

F – объёмная скорость потока элюента

H – высота, эквивалентная теоретической тарелке

k' – фактор удерживания вещества (коэффициент ёмкости вещества)

k'_0 – фактор удерживания вещества в элюенте "вода"

k'_i – фактор удерживания вещества на изократическом шаге элюирования

$M_{вод}$ – масса хроматографической колонки, заполненной водой

$M_{сух}$ – масса хроматографической колонки, не заполненной элюентом

N – эффективность хроматографической колонки (теоретические тарелки)

n – параметр в уравнении, описывающем зависимость коэффициента ёмкости от объёмной доли органического растворителя в подвижной фазе

S – площадь хроматографического пика

t – время

T - температура

u – линейная скорость потока элюента

v - объем малых условных порций элюента

v_{0i} – условная малая часть свободного объема колонки, соответствующая смещению зоны вещества-аналита при подаче в колонку объема v элюата

V_0 – мертвый объём хроматографической колонки

V_1 - объем элюата на изократическом шаге элюирования

V - текущий объем элюата

V_R - объём удерживания вещества

V'_R – объем удерживания вещества, уменьшенный на величину V_0 (приведенный объем удерживания)

V_z – объем задержки градиента

W – ширина основания хроматографического пика

$w_{1/2}$ – ширина хроматографического пика на половине его высоты

Δ - погрешность измерения, %

σ – стандартное отклонение

χ – параметр, задающий форму градиента

градиент "2000" – линейный градиент от 0 до 100% **Б** (объем элюции 2000 мкл)

градиент "4000" – линейный градиент от 0 до 100% **Б** (объем элюции 4000 мкл)

1. ВВЕДЕНИЕ

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – один из основных методов анализа, используемым в трех из каждых четырех аналитических лабораторий. По данным из обзора рынка химико-аналитических приборов [1] ВЭЖХ стоит на третьем месте после взвешивания и измерения pH. Она широко применяется во многих областях и промышленности, и медицины, и науки.

Одна из важнейшей проблем аналитической химии, в полной мере касающейся и ВЭЖХ – оптимизация аналитических методик. Цели оптимизации в каждом конкретном случае разные (чувствительность анализа, степень разделения веществ, надежность, простота, стоимость, "экологическая безопасность" и т. д.), но, чаще всего, речь идет об ускорении анализа. Ускорить ВЭЖХ-анализ можно двумя способами. Первый способ предполагает выполнение разделения на колонках с "субмикронными" адсорбентами при высокой скорости потока и повышенном давлении, реализуемом на дорогостоящих хроматографах для сверхвысокоэффективной ЖХ (СВЭЖХ). Второй способ ускорения разделения, предусматривающий оптимизацию параметров процесса, влияющих на степень разделения веществ, представляется нам экономически более оправданным.

Оптимизационные задачи можно решать экспериментально методом "проб и ошибок", но более рациональный подход – использование компьютерного моделирования. Применительно к ВЭЖХ моделирование заключается в прогнозировании "хроматографического поведения" веществ-аналитов в зависимости от их свойств и условий проведения анализа с последующим эмулированием хроматографического процесса, применяя компьютерные программы. В настоящее время на рынке есть, как минимум, 3 такие программы (*DryLab*® [2], *ACD/LC Simulator*® [3], *ChromSword*® [4]), с помощью которых можно эмулировать хроматографический процесс, но они весьма сложны для рутинной практики, не позволяют оптимизировать ряд важных параметров и стоимость их составляет 15-50 тыс. долларов США. Следует отметить, что математические алгоритмы, лежащие в основе этих программ, описываются авторами лишь обобщенно, что не позволяет исследователям реализовывать их в собственных программных продуктах.

Таким образом, разработка алгоритмов оптимизации хроматографических методик анализа представляется нам важной и актуальной задачей, и именно она является целью данной работы. В качестве объекта исследования мы выбрали наиболее универсальный и часто применяемый в аналитической химии вариант ВЭЖХ – градиентную обращенно-фазовую хроматографию с УФ-детектированием. Разработка алгоритмов оптимизации, предназначенных для компьютерного эмулирования хроматограмм, в первую очередь, предполагает установление функциональных связей удерживания веществ с параметрами градиента подвижной фазы, со скоростью элюции и с температурой колонки.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Характеристика метода ВЭЖХ

Как уже отмечалось во Введении, наиболее распространенным вариантом ВЭЖХ является обращенно-фазовая (ОФ) хроматография. В настоящее время около 90% всех анализов методом ВЭЖХ выполняют на химически привитых фазах, главным образом фазах с привитыми к поверхности силикагеля алкильными группами $–C_{18}H_{37}$ (фаза "C18") [5]. Схематично принцип ОФ хроматографии можно представить следующим образом:

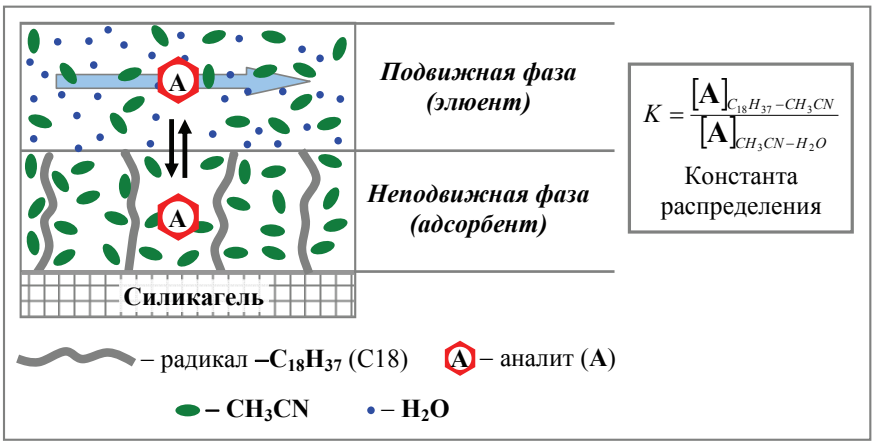


Рис. 1. Принцип распределительной (обращенно-фазовой) жидкостной хроматографии.

В ОФ ВЭЖХ разделение веществ происходит в результате различия в их константах распределения между подвижной и неподвижной фазами. Причиной удерживания веществ на колонке с обращенной фазой служат гидрофобные взаимодействия, приводящие к выталкиванию гидрофобных молекул (или их фрагментов) из подвижной фазы (структурированный водно-органический растворитель) в неподвижную фазу, представляющую собой "щетку" радикалов C18, "пропитанную" органическим растворителем (на рис. 1 - $–C_{18}H_{37} + CH_3CN$). Выбор состава элюента влияет на разделение веществ в большей степени, чем выбор типа неподвижной фазы. Общее правило заключается в том, что элюирующая сила органических растворителей возрастает с уменьшением их полярности.

Хроматограмма представляет собой зависимость концентрации вещества, пропорциональной отклику детектора, от объема подвижной фазы, прошедшей через колонку. Чтобы предсказать (эмулировать) хроматограмму, эту зависимость необходимо определить однозначно, для чего требуется рассчитать объемы удерживания веществ и ширины их пиков.

За время существования метода ВЭЖХ - он появился в начале 70-х годов прошлого века – было опубликовано большое количество работ, посвященных разработке алгоритмов для вычисления различных хроматографических параметров веществ, в частности, объемов удерживания. Одним из основных подходов к решению данной задачи является вычисление удерживания из полуэмпирических соотношений на основании данных, полученных экспериментально.

2.2. Зависимость фактора удерживания от состава бинарной подвижной фазы

В жидкостной хроматографии фактор удерживания анализируемого соединения (k') пропорционален константе распределения вещества в системе "адсорбент/элюент" и обычно вычисляется из уравнения

$$V_R = V_0(1+k'), \tag{1}$$

где V_R – объем удерживания вещества, а V_0 – мертвый объем колонки, равный объему подвижной фазы, находящейся в колонке [6]. Фактор удерживания является функцией концентрации сильного компонента подвижной фазы (c), роль которого в ОФ хроматографии играет органический растворитель в бинарной водно-органической подвижной фазе. Эта зависимость может быть описана соотношением [7]:

$$lg\, k' \approx lg\, k_0' - n \cdot c + m \cdot c^2\,, \tag{2}$$

где k_0', m и n – константы, а k'_0 – фактор удерживания анализируемого соединения в воде ($c = 0$). Вклад члена $m{\cdot}c^2$ сказывается лишь тогда, когда рассматривается очень широкий диапазон концентраций c. На практике нецелесообразно выходить за пределы $1 < k' < 20$ и, поскольку этим пределам отвечает достаточно узкий диапазон значений c, чаще всего используют упрощённое выражение [7, 8]:

$$lg\, k' \approx lg\, k_0' - n \cdot c \;\; или \;\; k' \approx k_0' \cdot 10^{-n \cdot c} \tag{3}$$

2.3. Нахождение констант k'_0 и n

Описаны два метода экспериментального определения констант k'_0 и n из уравнения (3) [9-12]. Согласно первому, записывают несколько (минимум две) хроматограмм вещества в изократическом режиме с различными концентрациями органического растворителя в подвижной фазе, а затем решают систему уравнений:

$$\begin{cases} lg\, k_1' = lg\, k_0' - n \cdot c_1 \\ lg\, k_2' = lg\, k_0' - n \cdot c_2 \end{cases} \tag{4}$$

Другим способом константы можно найти по величинам их уменьшенных объемов удерживания $V'_{R(g)} = V'_{R(g)} - V_0$, полученных из двух хроматограмм, записанных в разных линейных градиентных режимах, когда $c = A_G + B_G \cdot V$ [13]. В этом случае для каждого вещества надо записать два соотношения

$$\int_0^{V_0} dV_0 = \int_0^{V'_{R(g)}} \frac{1}{k'} dV = \frac{1}{k'_0} \cdot \int_0^{V'_{R(g)}} 10^{n(A_G + B_G \cdot V)} dV , \qquad (5)$$

составить из них систему уравнений и решить ее относительно k'_0 и n.

Когда веществ несколько, и они существенно различаются между собой по полярности, в двух изократических экспериментах при достаточном разрешении пиков, элюировать их из колонки не удается. Тогда преимущество получает второй метод, т. к. он экономит время и элюенты.

Следует отметить, что для использования второго способа нахождения констант необходима высокая точность формирования градиента концентрации органического растворителя (c) насосами хроматографа, что делает его чувствительным к особенностям гидравлической системы конкретного прибора. Кроме того, систему уравнений для нахождения констант можно решить только численными методами, а вычисления еще больше усложняются, если учесть, что реальный градиент начинается не в начале хроматограммы, а задерживается на величину объема смесителя и соединительных капилляров между смесителем и колонкой. В микроколоночной ВЭЖХ этот объем сравним с объемом колонки, и поэтому влияние величины задержки градиента на точность определения констант особенно заметное.

2.4. Зависимость фактора удерживания вещества от температуры

Зависимость величины фактора удерживания k' от температуры можно описать уравнением Вант-Гоффа [14]:

$$ln\, k' = \frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R} + ln(\frac{n_s}{n_m}) , \qquad (6)$$

где ΔH и ΔS – парциальные мольные вклады энтальпии и энтропии в распределение образца между двумя фазами, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, n_s/n_m – фазовое отношение.

Влияние температуры можно описать более простым уравнением [14, 15]:

$$\ln k' = A_T \cdot \frac{1}{T} + B_T , \qquad (7)$$

где A_T и B_T – константы.

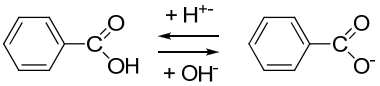
Коэффициент A_T обычно больше нуля, поэтому удерживание уменьшается с ростом температуры. Необходимо отметить, что приведенные выше уравнения справедливы лишь для изократической хроматографии.

Гант и др. [16] продемонстрировали совместное влияние температуры и состава бинарной подвижной фазы на удерживание и селективность. С увеличением температуры удерживание предсказуемо уменьшается, но селективность при этом меняется незначительно. Уменьшение удерживания, обусловленное повышением температуры, можно компенсировать увеличением содержания воды в подвижной фазе. Следовательно, при одновременном увеличении температуры и содержания воды в подвижной фазе селективность обычно возрастает, в то время как удерживание остается постоянным.

Отметим, что работа при повышенных температурах сопровождается снижением давления вследствие снижения вязкости элюента, но недостатком повышения температуры является сокращение времени "жизни" колонки, обусловленное ускорением растворения силикагеля в подвижной фазе, а также ускорением отщепления от него алкильных радикалов, что приводит к снижению эффективности колонки, проявляющейся в увеличении ширины пиков и искажению их формы.

2.5. Влияние значения pH подвижной фазы на удерживание вещества

Величина pH подвижной фазы влияет на удерживание вещества лишь в том случае, если при изменении pH происходит изменение структуры его молекулы, как, например, показано ниже для бензойной кислоты:



Это равновесие характеризуется константой диссоциации K_a. В ОФ ВЭЖХ для кислот и оснований существует правило общее – фактор удерживания для молекулярной формы вещества всегда больше, чем для ионной. Зависимость удерживания кислоты и основания от pH элюента показана на рис. 2.

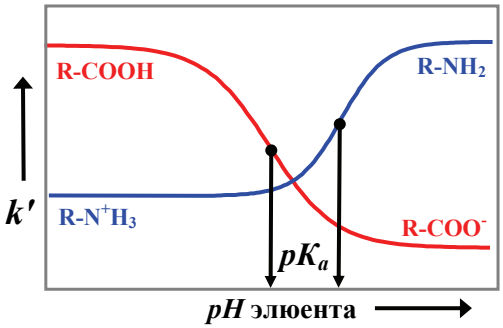


Рис. 2. Зависимость фактора удерживания кислоты и основания от pH элюента.

Для того чтобы получить высокую стабильность удерживая ионогенных соединений в ОФ хроматографии, в состав элюента необходимо вводить вещества-буферы, стабилизирующие значение pH подвижной фазы. Изменяя значение pH, можно варьировать удерживание аналитов в значительных пределах и, этим самым, оптимизировать методики анализа [17].

2.6. Вычисление объема удерживания вещества

Согласно уравнениям (1) и (3) при изократической элюции объем удерживания вещества вычисляется как:

$$V_R = V_0(1 + k_0^{'} \cdot 10^{-n \cdot C}) \tag{8}$$

Для градиентного элюирования уменьшенный объем удерживания вещества можно определить, решая уравнение (5) [18]. Логика такого подхода заключается в следующем. Прохождение объема элюата на малую величину dV влечет за собой сдвиг зоны вещества в колонке на долю ее объема dV_0. При бесконечно малом изменении объема элюата состав подвижной фазы и k' можно считать неизменными. Тогда можно записать соотношение для k' аналогично случаю изократического элюирования:

$$k' = \frac{dV}{dV_0} \tag{9}$$

Интегрируя это выражение с учетом уравнения (3), для линейного градиента получается соотношение:

$$V_{R(g)}^{'} = \frac{1}{n \cdot B_G} \cdot \lg(2{,}3 \cdot n \cdot B_G \cdot V_0 \cdot k_0^{'} \cdot 10^{-n \cdot A_G} + 1) \tag{10}$$

В кусочно-линейном градиенте перемещение вещества по колонке на i-том линейном участке градиента связано с объемом градиента соотношением, аналогичным уравнению (5):

$$\int_0^{V_{0i}} dV_0 = \int_0^{V_i^{'}} \frac{1}{k^{'}} dV = \frac{1}{k_0^{'}} \cdot \int_0^{V_{R(g)}^{'}} 10^{n(A_{Gi} + B_{Gi} \cdot V)} dV \ , \tag{11}$$

где V_{0i} - часть мертвого объема колонки, которую проходит при этом зона вещества. Очевидно, что когда вещество выходит из колонки $\sum_i V_{0i} = V_0$ и

$$V_{R(g)}^{'} = \sum_i V_i - V_{0i} = \sum_i \frac{1}{n \cdot B_{Gi}} \cdot \lg\left(2{,}3 \cdot n \cdot B_{Gi} \cdot V_{0i} \cdot k_0^{'} + e^{2{,}3 \cdot n \cdot A_{Gi}}\right) - \frac{A_{Gi}}{B_{Gi}} \tag{12}$$

В частном случае кусочно-линейного градиента – линейном градиенте с предшествующим изократическим шагом – уравнение (11) принимает вид

$$V'_{R(g)} = V_z + \frac{1}{n \cdot B_G} \cdot \lg\left[2{,}3 \cdot n \cdot B_G \cdot \left(V_0 - \frac{V_1}{k'_1}\right) \cdot k'_0 \cdot 10^{-n \cdot A_G} + 1\right], \quad (13)$$

где V_z - объем задержки градиента, k'_1 - фактор удерживания вещества на первом (изократическом) шаге, A_G - концентрация органического растворителя в подвижной фазе в начале градиента.

Данный метод расчета удерживания был предложен в работе [18]. Авторы применили его для вычисления объемов удерживания широкого ряда веществ, и различие вычисленных и экспериментально полученных величин V_R не превысило 8%. Однако следует отметить, что объем колонок, использованных в описанных экспериментах, существенно превышал объем задержки градиента, поэтому вычисления производились с использованием соотношения (10).

2.7. Вычисление параметров хроматографического пика

"Идеальный" хроматографический пик описывается уравнением

$$c(V) = \frac{S}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-0{,}5 \cdot \left(\frac{V - V_R}{\sigma}\right)^2}, \quad (14)$$

где $c(V)$ - изменение концентрации вещества, S – площадь пика, σ – стандартное отклонение. При изократическом элюировании стандартное отклонение пика вычисляется по уравнению

$$\sigma = \frac{V_R}{\sqrt{N}}, \quad (15)$$

где N – эффективность хроматографической колонки. В случае градиентной элюции стандартное отклонение вычисляют по уравнению [19]:

$$\sigma = \frac{V_{R(iso)}}{\sqrt{N}}, \quad (16)$$

где $V_{R(iso)}$ – объём удерживания вещества при изократическом элюировании с концентрацией сильного компонента в подвижной фазе, которая соответствует той концентрации сильного компонента, при которой вещество выходит из колонки, $c_{вых}=c(V_R)$ [20].

Ширина хроматографического пика связана со стандартным отклонением соотношением:

$$w_{1/2} = 2.354 \cdot \sigma, \quad (17)$$

где $w_{1/2}$ – ширина хроматографического пика на половине его высоты. В литературе описаны два различных подхода к расчёту этой величины.

Принимая во внимание уравнения (8), (15) и (17), для изократической элюции можно записать:

$$w_{1/2} = \frac{2.354 \cdot V_0}{\sqrt{N}} \left(k'_0 \cdot 10^{-nC} + 1 \right) \tag{18}$$

Вычисление ширины пика для градиентного элюирования проводится аналогичным образом с учетом вычисленного значения концентрации *c,* при которой вещество элюируется из колонки. В случае линейного градиента уравнение (18) принимает вид:

$$w_{1/2} = \frac{2.354 \cdot V_0}{\sqrt{N}} \left(k'_0 \cdot 10^{-n\left[A_G + B_G (V'_{R(g)} - V_z)\right]} + 1 \right) \tag{19}$$

Авторами работы [21] был предложен другой метод расчёта ширины хроматографических пиков при градиентном элюировании, основанный на следующем уравнении:

$$w_{1/2} = a + b \cdot k'_{вых}\,, \tag{20}$$

где $k_{вых}$ – коэффициент ёмкости вещества в подвижной фазе того состава, при котором оно покидает колонку, a и b – константы, определяемые экспериментально. Эти константы индивидуальны для каждого вещества. Их определяли из двух хроматограмм, решая систему уравнений:

$$\begin{cases} w_{1/2(1)} = a + b \cdot k'_{вых(1)} \\ w_{1/2(2)} = a + b \cdot k'_{вых(2)} \end{cases} \tag{21}$$

В работе [21] приведена сравнительная характеристика рассмотренных методов расчёта ширины пика, представленная на основании результатов двенадцати экспериментов, проведённых в градиентном режиме, причём в условиях четырёх различных градиентов. Ошибка расчёта ширины пиков из соотношения (20) не превысила 10%, в то время как отличие экспериментально полученных результатов от вычисленных из соотношения (19) достигало 56%.

Недостатком метода расчёта ширины пиков, приведённого в работе [21], является необходимость проведения большого числа предварительных экспериментов, что делает его трудоёмким по сравнению с альтернативным методом расчёта из работы [20].

2.8. Скорость потока подвижной фазы. Уравнение Ван-Деемтера

Скорость потока подвижной фазы является важным оптимизационным параметром в жидкостной хроматографии. С одной стороны она прямо определяет продолжительность

анализа, а с другой – влияет на эффективность колонки, то есть на ширину пика, что, в свою очередь, влияет на разрешение пиков (R_S), определяемое по уравнению:

$$R_{S(1,2)} = \frac{2 \cdot (V_{R2} - V_{R1})}{W_1 + W_2}, \qquad (22)$$

где W_1 и W_2 - ширины основания пиков.

Когда величина R_S выбирается в качестве параметра оптимизации, влияние скорости потока необходимо учитывать количественно.

Связь между высотой, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ или H), и линейной скоростью подвижной фазы подчиняется уравнению Ван-Деемтера [22]:

$$H = A + B/u + C \cdot u \qquad (23)$$

где H – высота, эквивалентная теоретической тарелке, ВЭТТ; u – линейная скорость элюента; A, B, C – коэффициенты, отражающие физические процессы, проходящие в колонке.

Графическое представление уравнения Ван-Деемтера приведено на рис. 3:

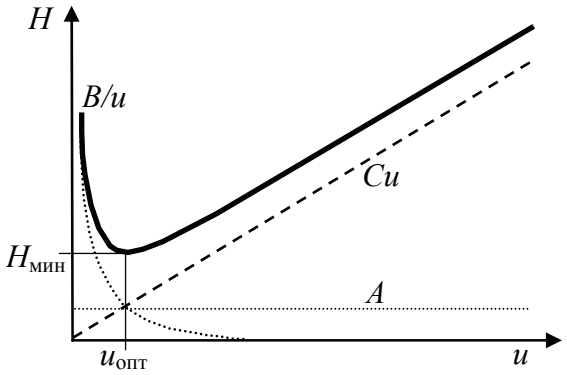


Рис. 3. Зависимость $H = f(u)$ согласно уравнению Ван-Деемтера.

Видно, что кривая имеет минимум ($H_{мин}$), который соответствует скорости потока, при которой ВЭТТ минимальна ($u_{мин}$). Именно при этой скорости потока эффективность колонки будет максимальной, а разрешение пиков – наилучшим. Таким образом, когда критерием оптимизации является эффективность колонки, то работать следует при оптимальной скорости потока, однако на практике обычно работают при скорости потока, превышающей оптимальное значение.

Использование уравнения Ван-Деемтера для эмулирования хроматограмм осложняется тем, что оно справедливо лишь для изократической элюции, а для градиентной хроматографии его применимость не очевидна. Кроме того, многочисленные литературные данные [23-29] свидетельствуют о том, что даже в изократической

хроматографии зависимость эффективности колонки от скорости потока различна для веществ с разными значениями k' (см. рис. 4).

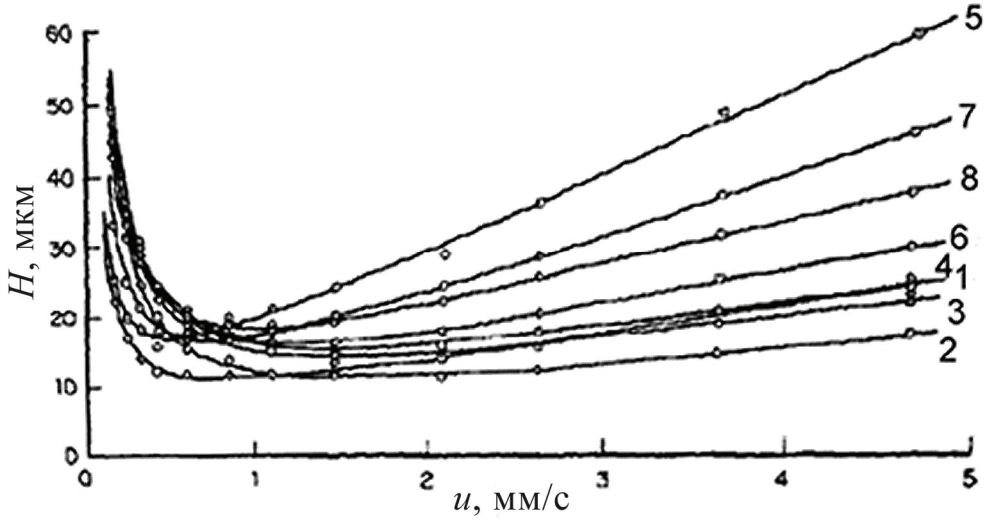


Рис. 4. Зависимость величины H от скорости потока [25].
Колонка: 250 × 8 мм, заполненная силикагелем *Partisil* 10; элюент: 5% этилацетата в *н*-гексане. Вещества: 1– тридецилбензол (k'=0), 2– *п*-ксилол (k'=0,09), 3– анизол (k'=0,51), 4– нитробензол (k'=1,55), 5– диоктилфталат (k'=1,89), 6– ацетофенон (k'=2,95), 7– дипропилфталат (k'=4,25), 8– *о*-крезол (k'=4,87).

2.9. Оптимизация разделения в обращенно-фазовой жидкостной хроматографии

Цель хроматографического анализа включает в себя осуществление разделения аналитов за приемлемое (минимальное) время. На качество и скорость разделения в ВЭЖХ влияют многочисленные параметры (свойства адсорбента, размеры колонки, характеристики ее упаковки, состав элюента, параметры детектора и т. п.). Это, с одной стороны, создает практически неограниченные возможности для разработки методик анализа, а с другой стороны – требует проведения длительных исследований, значительных затрат на расходуемые материалы и амортизацию оборудования. Это связано с тем, что теория хроматографии не всегда позволяет однозначно предсказать, как изменится разделение при изменении тех или иных условий. Растущая потребность в надежных и быстрых методиках анализа заставляет обращаться к математическим способам прогнозирования результатов при разработке методик.

При оптимизации разделения часто необходимо находить компромисс между двумя основными критериями: необходимым разрешением пиков на хроматограмме и продолжительностью анализа. Подходы к оптимизации разделения в ОФ-ВЭЖХ реализованы в нескольких известных коммерческих программных продуктах, таких как *DryLab*® [30-33]; *ChromSword*® [34], *ACD/LC Simulator*® [35].

Эти программы постоянно совершенствуются и учитывают все основные важные инновации и достижения в развитии теории хроматографии. Они "стыкуются" с большим количеством хроматографов, представленных на рынке, позволяют оптимизировать практически все виды жидкостной хроматографии (обращенно- и нормально-фазовую, ионную и ионообменную, гидрофильную и гидрофобную, эксклюзионную и т. д.), содержат в своих библиотеках характеристики десятков адсорбентов. Однако, такая "универсальность", во многом продиктованная рекламными целями и конкурентной борьбой, делает программы излишне перегруженными и очень сложными для освоения даже для квалифицированных специалистов. Более того, оптимизация температуры и скорости потока в этих программах хорошо реализована лишь для изократической элюции, а для градиентной – весьма приблизительно. Поскольку авторы программ из коммерческих соображений практически не раскрывают применяемые алгоритмы, в тех случаях, когда предсказанные результаты заметно не совпадают с экспериментальными данными, пользователи программ должны сами искать причину: или выбранная модель неверная, или причина связана с "приборными" ошибками. Обращает на себя внимание также и стоимость названных программных продуктов. Цена версий, которые включают в себя возможность работы с многоканальными хроматограммами, достигает 50000 долларов США.

Учитывая вышесказанное, мы считаем весьма актуальным разработку алгоритмов оптимизации обращенно-фазовой хроматографии с многоканальным детектированием, которые бы позволили обойтись минимальным числом предварительных экспериментов, необходимых для получения отправных данных, позволяющих затем оптимизировать методику анализа путем эмулирования хроматограмм, изменяя форму градиента, температуру и скорость потока. В конечном итоге эти алгоритмы предполагается использовать в максимально простой и недорогой компьютерной программе, предназначенной для использования в повседневной практике.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Оборудование

ВЭЖХ проводили на хроматографе "Милихром А-02" (ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск) с колонкой Ø 2×75 мм, заполненной сорбентом *ProntoSIL*-120-5-*C*18-*AQ* ("*Bischoff Analysentechnik und Geräte GmbH*", Германия).

Расчет констант и объемов удерживания проводили с помощью компьютерной программы "Оптимизатор" (разработчик Е. Г. Барам, Институт систем информатики им. А.П. Ершова Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск).

Использовали весы аналитические электронные "*Adventurer AR*0640" ("*Ohaus*", Швейцария), погрешность взвешивания ±0,2 мг; автоматические пипетки переменного объема 20÷200 мкл и 100÷1000 мкл со сменными наконечниками "Ленпипет Колор" (ЗАО "ТермоЛабсистемс", г. Санкт-Петербург).

3.2. Математическое обеспечение

Обработку хроматограмм проводили с помощью компьютерной программы "МультиХром-СПЕКТР" (ЗАО "Амперсенд", г. Москва).

Эмулирование хроматограмм проводили с помощью компьютерного тренажера "Жидкостный хроматограф" (ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск) [36] и программы "*ACD/LC-GC Simulator* 2012" ("*Advanced Chemistry Development, Inc*." (*ACD/Labs*), г. Торонто, Канада).

3.3. Материалы

Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил для ВЭЖХ "сорт 0" (НПК "Криохром", г. Санкт-Петербург), метанол квалификации "х.ч." (ЗАО "Вектон", г. Санкт-Петербург), аттестованный раствор [4 М $LiClO_4$ - 0,1 М $HClO_4$] в воде (ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск).

Йодид калия, парацетамол, 4-гидроксибензойная кислота, 3-нитроанилин, бензойная кислота, 2-нитроанилин, 2-нитрофенол, 4-нитротолуол, нафталин, пирен, стрептоцид, теобромин, ванилин, уридин, кофеин, бензанилид, 4-нитробензойная кислота, ацетилсалициловая кислота, новокаин, 3-гидроксибензойная кислота, теофиллин, сахарин, фенилаланин, триптофан, 2,4-динитрофенол, 1-нитронафталин, 1-нитро-4-хлорбензол, салициловая кислота, 1-нафтол квалификации "х.ч." или "для фармакопеи". Диэфиры фталевой кислоты (диметилфталат, ди-*н*-бутилфталат, *н*-бутилбензилфталат, *бис*-(2-

этилгексил)-фталат, ди-*н*-октилфталат, ди-*н*-нонилфталат) ("*Supelco*", США). Список и структурные формулы веществ-аналитов, использованных в работе, приведены в Приложении 1.

3.4. Приготовление исходных растворов

Все растворы готовили смешиванием исходных (запасных) растворов веществ (кроме эфиров фталевой кислоты), растворенных в метаноле с концентрацией 1 мг/мл.

Модельный раствор "Тест-10" имел состав: йодид-ион, парацетамол, 4-гидроксибензойная кислота, 3-нитроанилин, бензойная кислота, 2-нитроанилин, 2-нитрофенол, нафталин, 4-нитротолуол, пирен. Концентрация веществ составила по 0,1 мг/мл.

Модельный раствор "Тест-8" имел состав: йодид-ион, кофеин, 3-нитроанилин, нафталин, 2-нитроанилин, 2-нитрофенол, 4-нитротолуол, пирен. Концентрация веществ составила по 0,1 мг/мл.

Модельный раствор "Тест-5" имел состав: йодид-ион, 3-нитроанилин, 2-нитроанилин, 2-нитрофенол, 4-нитротолуол. Концентрация веществ составила по 0,1 мг/мл.

Растворы веществ для работы совместно компьютерной программой-тренажером "Жидкостный хроматограф":

- йодид-ион, сахарин, теофиллин, 3-гидроксибензойная кислота, новокаин; ацетилсалициловая кислота; 4-нитробензойная кислота; бензанилид с массовыми концентрациями по 0,1 мг/мл. Растворитель – метанол.
- парацетамол, 4-гидроксибензойная кислота, 3-нитроанилин, бензойная кислота, нафталин, 2-нитроанилин, 2-нитрофенол, 4-нитротолуол, пирен с массовыми концентрациями по 0,1 мг/мл. Растворитель – метанол.
- фенилаланин, 2,4-динитрофенол, 1-нафтол, триптофан, 1-нитро-4-хлорбензол, салициловая кислота 1-нитронафталин с массовыми концентрациями по 0,1 мг/мл. Растворитель – метанол.
- стрептоцид, ванилин, уридин, кофеин, теобромин с массовыми концентрациями по 0,1 мг/мл. Растворитель – вода.

Раствор диэфиров фталевой кислоты готовили смешиванием равных объемов исходных растворов веществ в метаноле с концентрацией по 3 мг/мл. Тестовая смесь диэфиров фталевой кислоты имела состав: диметил-, ди-*н*-бутил-, *н*-бутилбензил-, ди-*н*-октил-, ди-*н*-нонил-, *бис*(2-этилгексил)-фталат с массовыми концентрациями по 0,5 мг/мл.

3.5. Модификация градиентного насоса хроматографа "Милихром А-02"

Хроматограф "Милихром А-02" состоит из двухшприцевого градиентного насоса объемом 5 мл (2,5 + 2,5 мл) с возможностью подачи элюента в диапазоне объемных скоростей от 5 до 1000 мкл/мин; автоматического дозатора на 46 проб; термостатируемой колонки Ø 2×75 мм; спектрофотометрического детектора с возможностью многоволновой регистрации (до 8 длин в цикле) и электронного блока. Схема хроматографа приведена на рис. 5.

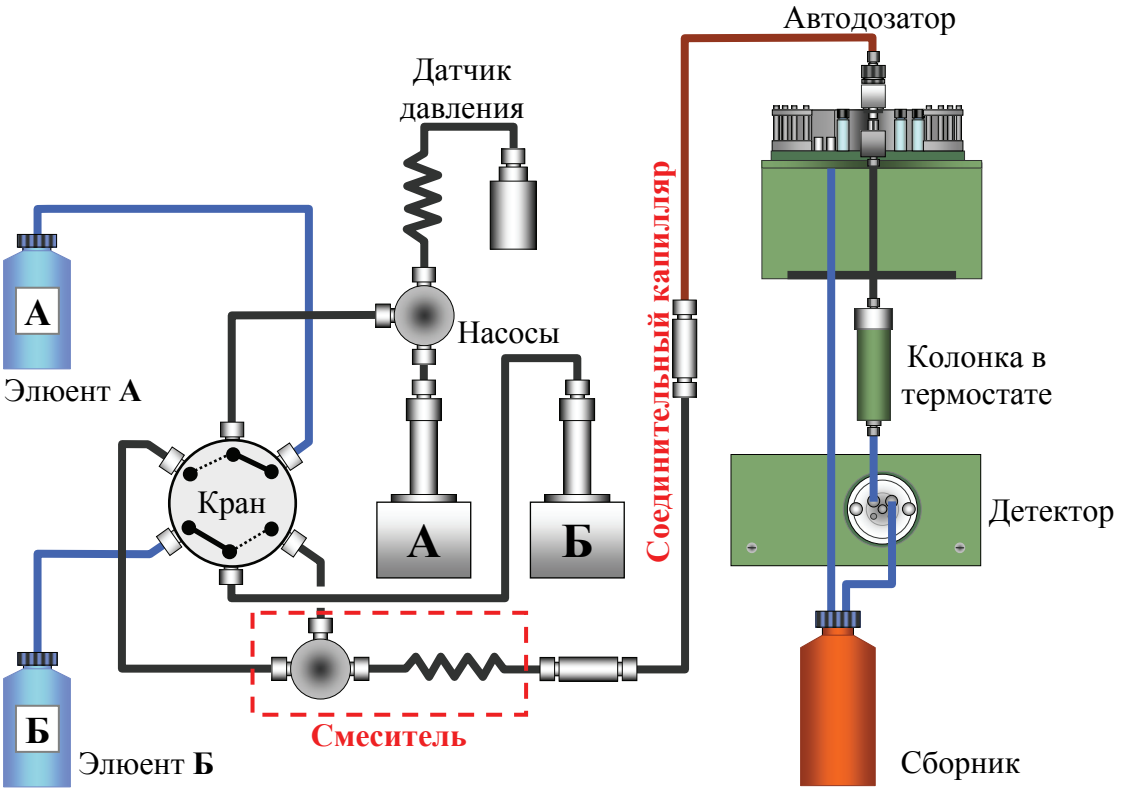


Рис. 5. Блок-схема хроматографа "Милихром А-02"

Модификация градиентного насоса состояла в переносе смесителя на консоль автодозатора и замене пассивного смесителя объемом 80 мкл на смеситель объемом 22 мкл (см. рис. 6).

3.6. Определение объема смесителя

Объем смесителя определяли весовым способом. Смеситель с помощью шприца заполняли водой и взвешивали. Затем его высушивали, пропуская через него воздух, до постоянного веса и снова взвешивали. Объем находили по разности масс заполненным водой и высушенным смесителем.

Объем смесителя вычисляли по уравнению:

$$V = \frac{\Delta m}{\rho_{H_2O}} = \frac{m_{\text{вод}} - m_{\text{сух}}}{\rho_{H_2O}}, \qquad (24)$$

где $m_{вод}$ и $m_{сух}$ – соответственно масса смесителя, заполненного водой, и масса смесителя, высушенного до постоянного веса. Объем нового смесителя составил 22 мкл.

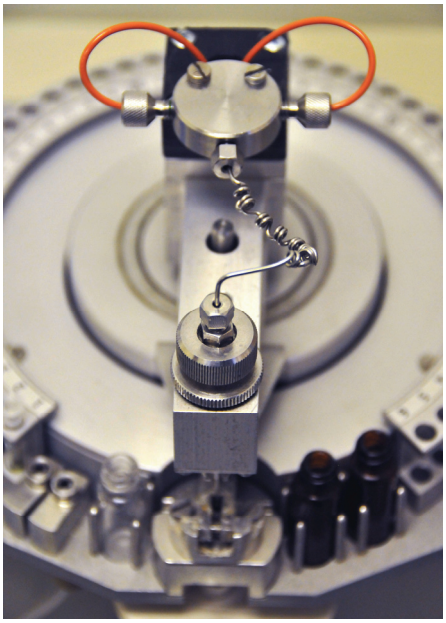


Рис. 6. Модифицированный пассивный смеситель.

3.7. Определение объема задержки градиента

Объем задержки (сдвига) реально формируемого градиента относительно заданного определяли фотометрически. Для этого шприц насоса **А** заполняли водой, а насоса **Б** – раствором 2-нитроанилина в ацетонитриле. Смеситель соединяли с кюветой детектора капилляром из фторопласта или из нержавеющей стали. Соединительные капилляры имели следующие параметры: $d_{\text{внутр}} = 0{,}2$ мм, $l = 200$ мм, $V = 6{,}3$ мкл. Оптическую плотность элюата измеряли при длине волны 230 нм. Схема соединений показана на рис. 7.

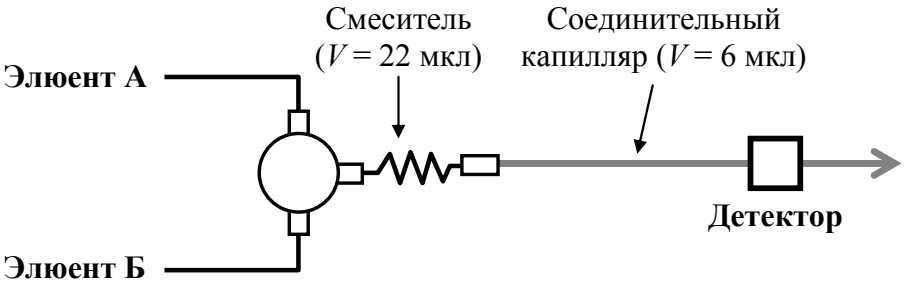


Рис. 7. Схема соединения модифицированного пассивного смесителя с детектором.

3.8. Определение величины внеколоночного уширения пиков

Определение величины внеколоночного уширения пиков проводили из хроматограммы, полученной в следующих условиях:

- элюент **А**: 0,2 М $LiClO_4$ - 0,005 М $HClO_4$
- элюент **Б**: Ацетонитрил
- изократическая элюция: элюент 50% **Б**
- скорость потока: 100 мкл/мин
- температура колонки: 40 °С
- детектирование при 210 нм
- объем вводимой пробы: 2 мкл (модельный раствор "Тест-5")

3.9. Хроматографические процедуры

Все хроматографические эксперименты проводились на хроматографе "Милихром А-02". В качестве элюентов использовали воду, метанол, ацетонитрил, водный раствор 0,2 М $LiClO_4$ – 0,005 М $HClO_4$ и их смеси. Условия хроматографирования указаны в подписях к рисункам.

3.10. Подготовка образцов для ВЭЖХ-анализа

Навеску порошка измельченной коры осины (100 мг) помещали в центрифужную пробирку на 1,5 мл, суспендировали в 800 мкл дистиллированной воды, выдерживали 10 мин на кипящей водяной бане при периодическом встряхивании, охлаждали до комнатной температуры, центрифугировали 10 мин при 10000 g, переносили 50 мкл супернатанта в пробирку автодозатора хроматографа и хроматографировали.

Таблетку "Цитрамона-П" измельчали в ступке и растворяли в течение десяти минут в одном литре воды нагретой до 40 °С при перемешивании на магнитной мешалке. Далее суспензию центрифугировали 5 мин при 10000 g, переносили 50 мкл супернатанта в пробирку автодозатора хроматографа и хроматографировали.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Модификация смесителя в градиентном насосе

Одной из проблем градиентной хроматографии является соответствие заданной формы градиента изменения состава элюента той форме, которая реализуется на практике. Эти формы между собой всегда отличаются. Форма, которая задается, представляет собой строгую математическую функцию (например, линейный градиент концентрации ацетонитрила в воде), которая описывает изменение концентрации ацетонитрила во времени в точке смешивания элюентов. Поскольку между этой точкой и колонкой расположен смеситель и соединительные капилляры, реальная концентрация ацетонитрила на входе в колонку на этот момент времени всегда меньше заданной. Кроме того, в результате неидеальности смешивания и движения жидкости по капиллярам происходит размывания концентрационной зоны, что приводит не только к задержке градиента, но и к искажению его формы. Очевидно, что чем меньше объем смесителя и чем короче соединительные капилляры, тем в меньшей степени будут различаться заданная и реальная форма градиента, и тем точнее можно будет предсказывать удерживание веществ на хроматограммах при элюции в разных градиентах. Из общих соображений можно сказать, что объем смесителя, включая объем задержки градиента должен быть меньше мертвого объема колонки. Это обстоятельство, кстати, не позволяет использовать оптимизационные программы с обычными хроматографами, которые рассчитаны на применение колонок с $V_0 = 2\text{-}4$ мл, когда в них устанавливают микроколонку, имеющую $V_0 = 0.1\text{-}0.2$ мл.

Для минимизации искажения формы градиента и объема его задержки в хроматографе "Милихром А-02" мы изменили конструкцию смесителя, как описано в разделе 3.5. Объем смесителя был уменьшен с 80 до 22 мкл, а объем соединительного капилляра – со 120 до 6 мкл (см. рис. 6 и 7).

Объем задержки определяли по методике, приведенной в разделе 3.7. Результаты измерений при скоростях потока 50, 100, 200 мкл/мин показаны на рис. 8. Видно, что при увеличении скорости потока в 4 раза форма кривой практически не меняется.

Обращает на себя внимание искривление в середине кривой оптической плотности на рис. 8А, которое не наблюдается на рис. 8Б. Это явление связано с адсорбцией 2-нитроанилина на стенках фторопластового капилляра в воде с последующей десорбцией в ацетонитриле. После замены гидрофобного фторопласта на нержавеющую сталь этот эффект не наблюдался.

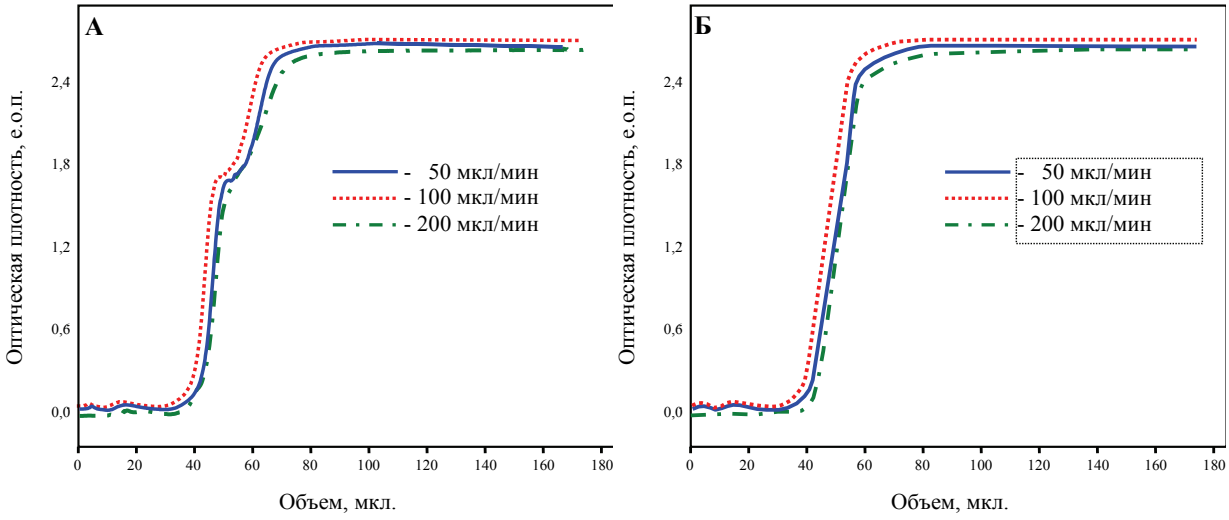


Рис. 8. Профили ступенчатого градиента при соединении инжектора с кюветой с помощью капилляра.
Ступень градиента – скачок концентрации раствора 2-нитроанилина в воде до ацетонитрила. **А**- капилляр из фторопласта; **Б**- капилляр из нержавеющей стали.

Объем задержки смесителя определяли по пересечению касательных, проведенных как показано на рис. 9. Из полученного объема отнимали 6 мкл (объем соединительного капилляра), что дало, в итоге, 36 мкл.

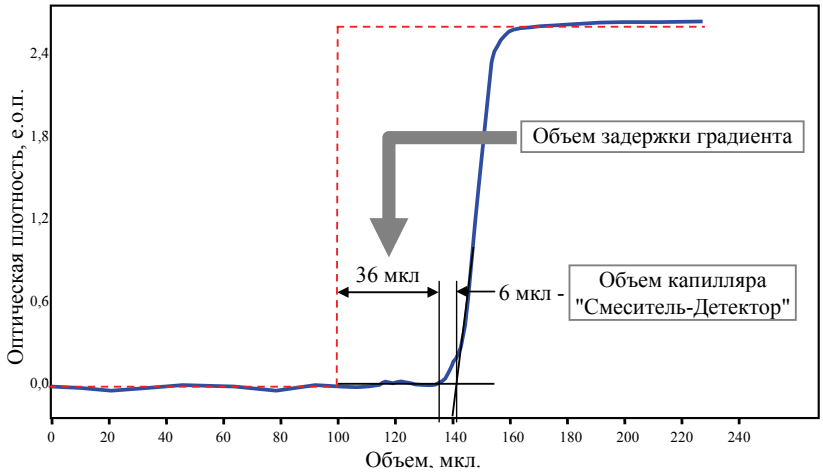


Рис. 9. Измерение объема задержки градиента.
Эксперимент выполняли согласно схеме, приведенной на рис. 7.

На рис. 10 показаны профили линейных градиентов, записанные с новым и прежним смесителями. Видно, что задаваемая форма градиента весьма хорошо реализуется градиентным насосом хроматографа "Милихром А-02" в обоих случаях, но с уменьшенным смесителем она практически полностью совпадает с заданной функцией без сдвига, который присутствует на рис. 10Б.

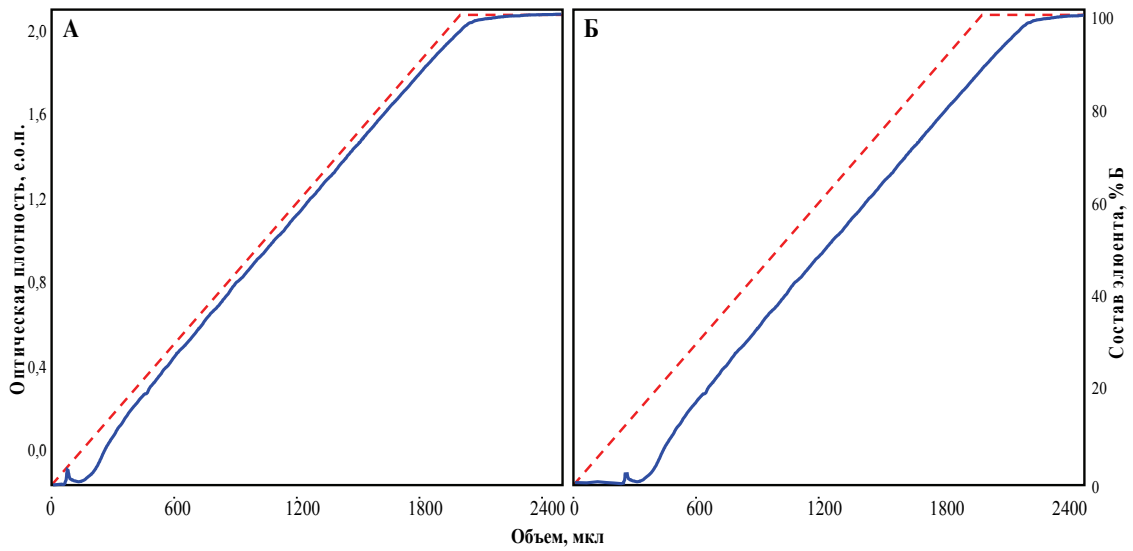


Рис 10. Профили линейных градиентов концентрации элюента с уменьшенным смесителем (**А**) и с обычным (**Б**) при скорость потока 100 мкл/мин.
- - - - заданная форма градиента; ——— - реальная форма градиента

4.2. Определение величины внеколоночного уширения пиков на хроматограмме

Для эмулирования хроматограмм необходимо учитывать величину внеколоночного уширения концентрационной зоны, которое возникает при движении зоны по капилляру от колонки к детектору и в измерительной ячейки детектора. Если в идеальной хроматографии стандартное отклонение хроматографического пика при изократической элюции определяется уравнением (15), то в реальности пик будет шире на некую величину, определяемую конструкцией хроматографа [37]. Эту величину, называемую "экстраколоночным уширением", можно найти экспериментально, хроматографируя в изократических условиях смесь, содержащую минимум 2 вещества, и решив систему уравнений для неизвестных N и $\sigma_{экстра}$:

$$\begin{cases} N = \left(\dfrac{V_{R1}}{\sqrt{\sigma^2_{хром1} - \sigma^2_{экстра}}} \right)^2 \\ N = \left(\dfrac{V_{R2}}{\sqrt{\sigma^2_{хром2} - \sigma^2_{экстра}}} \right)^2 \end{cases}, \qquad (25)$$

где N – эффективность колонки; V_{R1} и V_{R2} – объемы удерживания вещества 1 и 2; $\sigma_{хром1}$ и $\sigma_{хром1}$ – стандартные отклонение пиков веществ 1 и 2, вычисленные из полученной хроматограммы; $\sigma_{экстра}$ – стандартное отклонение, обусловленное "внеколоночными" факторами.

Для определения $\sigma_{экстра}$ мы хроматографировали смесь "Тест-5" (см. рис. 11) и из полученной хроматограммы вычисляли значения N и k' для каждого вещества (см. рис. 12).

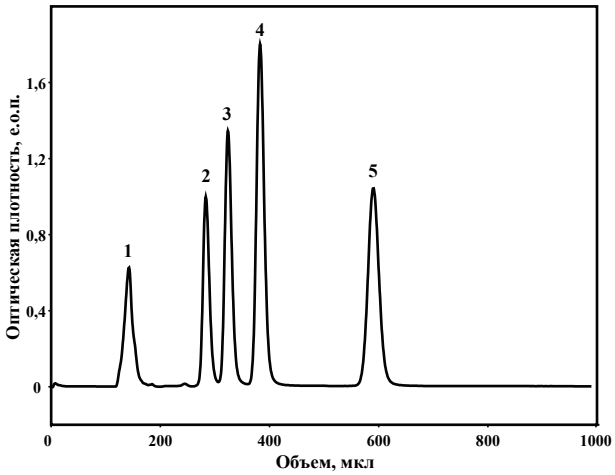


Рис. 11. Хроматограмма раствора "Тест-5". Условия приведены в разделе 3.8.
1- йодид-ион; 2- 3-нитроанилин; 3- 2-нитроанилин; 4- 2-нитрофенол; 5- 4-нитротолуол.

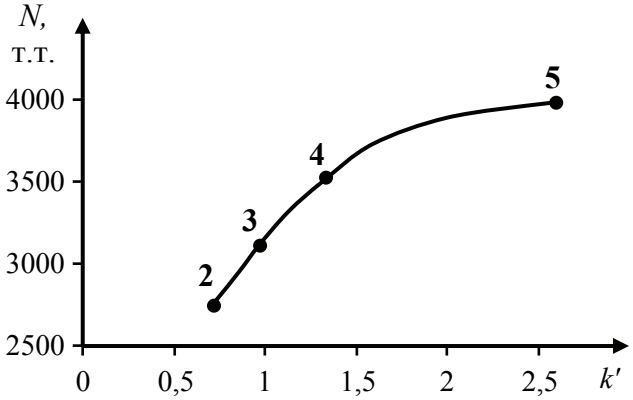


Рис. 12. Зависимость вычисленного значения эффективности колонки (N) от фактора емкости (k'). Значения k' веществ взяты из хроматограммы на рис. 11.

Из полученных данных вычисляли "исправленную" эффективность колонки ($N_{выч}$) и $\sigma_{экстра}$, решая систему уравнений (25) для пиков 2-5. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Вычисленные и экспериментально найденные эффективности колонки и стандартные отклонения пиков.

Вещество	$N_{хром}$, т.т.	$N_{выч}$, т.т.	$\sigma_{эксп}$, мкл	$\sigma_{экстра}$, мкл
3-Нитроанилин	2766	4384	5,4	3,3
2-Нитроанилин	3099	4614	5,8	3,3
2-Нитрофенол	3478	4678	6,5	3,3
4-Нитротолуол	3940	4493	9,4	3,3

Таким образом, величина $\sigma_{экстра}$ для нашей хроматографической системы составила 3,3 мкл. С учетом $\sigma_{экстра}$ эффективность колонки ($N_{выч}$) для всех веществ близка и равна примерно 4500 т.т.

4.3. Вычисление объемов удерживания веществ при градиентном элюировании

Опираясь на методе расчета объемов удерживания веществ, описанном в разделе 2.6., V_R в градиентной ОФ ВЭЖХ рассчитывается следующим образом:

1. Зависимость состава подвижной фазы от объема элюата задается функцией градиента *c=f(V)*. Вид этой функции задается перед началом анализа.

2. Объем элюата условно разбивается на малые порции, имеющие объем $v = 0{,}1$ мкл. Состав подвижной фазы в этом объеме считаем постоянным. Зона вещества, согласно соотношению (8), при этом смещается по колонке на часть мертвого объема V_0. На первом шаге объем смещения будет равен:

$$v_{01} = \frac{v}{1 + k'_0 \cdot 10^{-nC_0}} \tag{26}$$

3. Из соотношения, задаваемого функцией *c=f(V)*, рассчитывается реальный состав подвижной фазы в той части колонки, где находится вещество.

4. Шаги 2 и 3 повторяются до тех пор, пока вещество не выйдет из колонки, то есть пока не выполнится соотношение

$$V_0 = \sum_{i=1}^{m} \frac{v}{1 + k'_0 \cdot 10^{-nC_i}}, \tag{27}$$

где m - число шагов. Объем удерживания в этом случае вычисляется следующим образом:

$$V_R = v \cdot m \tag{28}$$

Расчет величин V_R с помощью предложенного пошагового алгоритма легко реализуется на персональных компьютерах. Его преимущество перед аналитическим методом расчета, описанном в разделе 2.6., заключается в возможности быстрого расчета объема удерживания для градиентов любой сложности.

Для эмулирования хроматограмм на хроматографе с новым смесителем программа-тренажер была модифицирована: объем задержки был уменьшен с 290 до 36 мкл.

Для апробации алгоритма нахождения констант k'_0 и n из двух градиентных хроматограмм на хроматографе были получены две хроматограммы раствора «Тест-8» в двух линейных градиентах (2000 и 4000 мкл) от 0 до 100% Б в системах растворителей вода-ацетонитрил и вода-метанол (см. рис. 13 и 14.) Экспериментально найденные и

вычисленные объемы удерживания веществ, а также погрешности, вычисленных значений V_R приведены в табл. 2. Погрешности вычисляли как:

$$\Delta=(1-V_{R\text{тренажер}}/V_{R\text{эксперимент}})\cdot 100\% \qquad (29)$$

В табл. 3 и 4 приведены значения констант k'_0 и n для систем вода-ацетонитрил и вода-метанол, найденных из систем уравнений (10) численным способом.

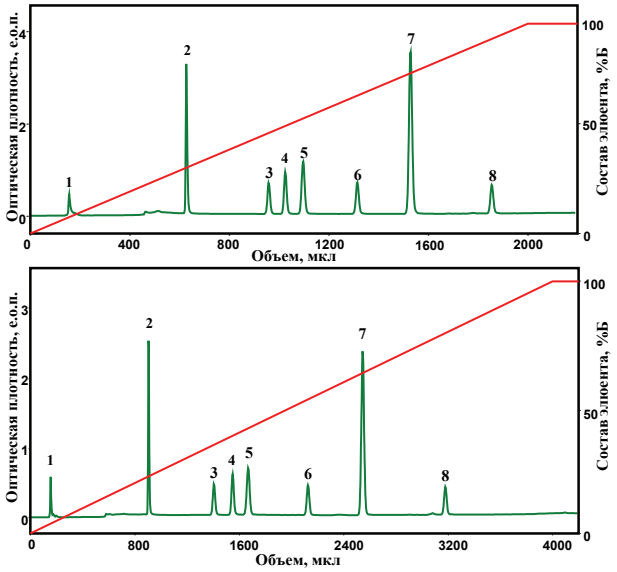


Рис. 13. Хроматограммы раствора "Тест-8".
Элюенты: **А** - вода, **Б** - ацетонитрил; объем пробы: 4 мкл; скорость потока: 100 мкл/мин; температура колонки: 40 °С. Пики на хроматограмме: 1- йодид-ион; 2- кофеин; 3- 3-нитроанилин; 4- 2-нитроанилин; 5- 2-нитрофенол; 6- 4-нитротолуол; 7 – нафталин; 8 - пирен.

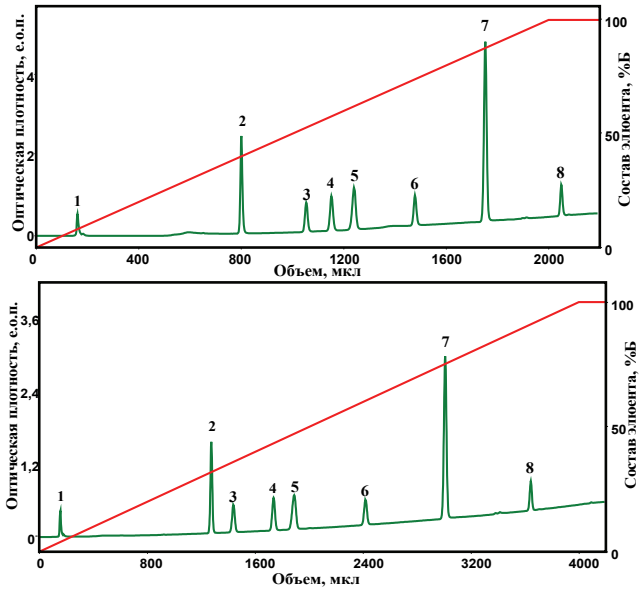


Рис. 14. Хроматограммы раствора "Тест-8".
Элюенты: **А** - вода, **Б** - метанол; объем пробы: 4 мкл; скорость потока: 100 мкл/мин; температура колонки: 40 °С. Идентификация пиков такая же, как на рис. 13.

Из табл. 2 следует, что максимальное различие значений объемов удерживания в эмулированных и экспериментальных хроматограммах не превышают 8%, что представляется приемлемым.

Таблица 2. Объемы удерживания веществ раствора "Тест-8" в генерированных и реальных хроматограммах в системе вода-ацетонитрил.

Объем гради-ента, мкл	Хромато-грамма	Объем удерживания веществ V_R, мкл							
		1	2	3	4	5	6	7	8
2000	Тренажер	150	637	873	1049	1132	1423	1595	1912
	Хроматограф	157	630	887	1025	1102	1318	1537	1862
ΔV_R, %		4,6	1,1	1,6	2,3	2,7	7,9	3,8	2,7
4000	Тренажер	150	848	1131	1532	1646	2178	2512	3281
	Хроматограф	156	827	1199	1499	1633	2089	2527	3170
ΔV_R, %		3,8	2,5	5,7	2,2	0,8	4,3	0,6	3,5

Таблица 3. Значения констант k'_0 и n для системы вода-ацетонитрил.

Константы	2	3	4	5	6	7	8
k'_0	20,86	29,30	42,40	49,79	152,68	317,57	977,19
n	0,0615	0,0323	0,0338	0,0323	0,0351	0,0340	0,0331

Таблица 4. Значения констант k'_0 и n для системы вода-метанол.

Константы	2	3	4	5	6	7	8
k'_0	32,05	20,71	55,26	64,45	253,24	1374,3	14871
n	0,0404	0,0226	0,0315	0,0295	0,0342	0,0381	0,0438

Подставляя полученные константы k'_0 и n в уравнение (10), мы предсказывали объемы удерживания веществ. Отклонения экспериментально полученных от вычисленных объемов удерживания представлены в табл. 5. Погрешность составила не более 0,5% для системы вода-ацетонитрил и не более 1,6% для системы вода-метанол, что очень хорошо.

Для градиентов сложной формы, профили которых показаны на рис. 15, погрешность составила не более 6% (см. табл. 6), что нам представляется вполне удовлетворительным.

Таблица 5. Вычисленные и экспериментально найденные объемы удерживания веществ в градиенте "3000".

Значения V_R, мкл	Номера пиков (вода-ацетонитрил)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Вычисленные	-	781	1206	1311	1408	1745	2062	2543
Экспериментальные	155	778	1209	1315	1414	1750	2067	2545
Δ, %	-	0,4	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2	0,1
Значения V_R, мкл	Номера пиков (вода-метанол)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Вычисленные	-	1096	1281	1470	1595	1967	2398	2859
Экспериментальные	161	1109	1298	1495	1618	1977	2400	2860
Δ, %	-	1,2	1,3	1,6	1,4	0,5	0,1	0,0

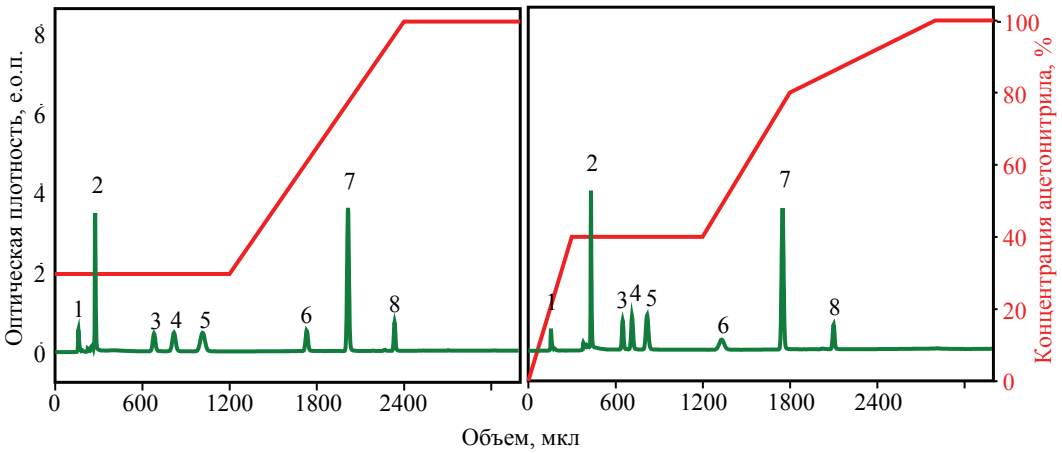


Рис. 15. Хроматограммы раствора "Тест-8" в градиентах сложной формы. Элюенты: **А** - вода, **Б** - ацетонитрил; объем пробы: 4 мкл; скорость потока: 100 мкл/мин; температура колонки: 40 °С. Идентификация пиков такая же, как на рис. 12.

Таблица 6. Вычисленные и экспериментально найденные объемы удерживания веществ в градиенте сложной формы.

Значения V_R, мкл	Номера пиков							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Вычисленные	-	406	628	694	795	1359	1769	2094
Экспериментальные	157	432	651	714	819	1331	1750	2101
Δ, %	-	6,0	3,5	2,8	2,9	2,1	1,1	0,3

4.4. Влияние температуры колонки на удерживание веществ в ОФ ВЭЖХ

Температура является важным параметром хроматографической системы, влияющей на удерживание веществ. С одной стороны для получения воспроизводимых результатов температура должна быть стабилизирована, а с другой стороны, изменяя температуру, можно изменять удерживания веществ и, тем самым, улучшать разделение.

Таким образом, эмулирование хроматограмм при разных температурах представляется важным для оптимизации хроматографического процесса.

Удерживание веществ зависит от абсолютной температуры (T) и зависимость k' для случая изократического элюирования можно описать уравнением:

$$ln\,k' = \frac{A_{Tизо}}{T} + B_{Tизо} \qquad (30)$$

где $A_{Tизо}$ и $B_{Tизо}$ - константы.

Очевидно, для эмулирования изократических хроматограмм достаточно знать значения констант $A_{Tизо}$ и $B_{Tизо}$ для каждого вещества, чтобы однозначно вычислять объемы удерживания. Эти константы можно определить из двух изократических хроматограмм, выполненных при разных температурах.

Для градиентной хроматографии, когда величина k' изменяется в процессе движения вещества вдоль колонки, применимость уравнения (30) становится не очевидной. Однако, нами экспериментально показано, что в диапазоне температур 35-80 °С зависимость $ln\ V_R$ от обратной температуры также линейна. Зависимости $ln\ V_R$ от $1/T$ для ряда веществ, хроматографированных в градиентном режиме (градиент "4000") приведены на рис. 16. Таким образом, для нахождения констант A_T и B_T достаточно провести два эксперимента при разных температурах.

Сравнение экспериментальных и вычисленных значений объемов удерживания для температуры 60 °С в линейном градиенте концентрации ацетонитрила, а также погрешности, вычисленных значений V_R приведено в табл. 7.

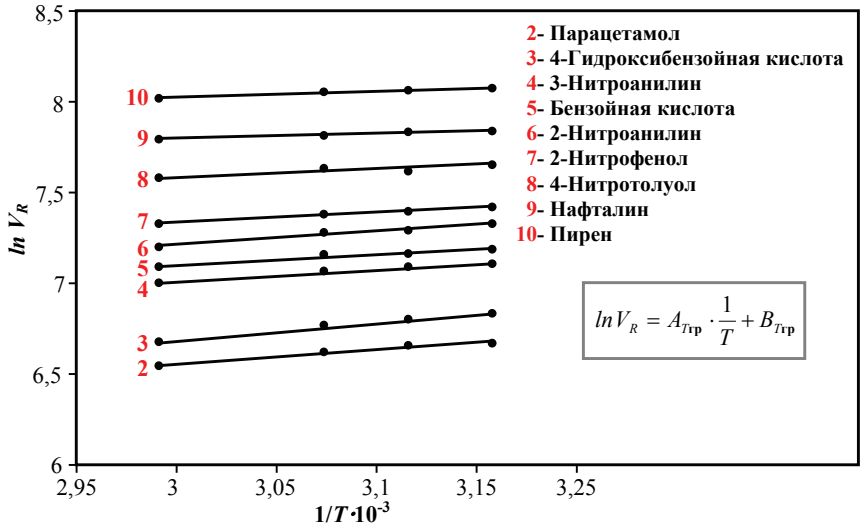


Рис. 16. Экспериментальные зависимости $ln\ V_R$ от $1/T$ для выбранных веществ. Хроматография в градиентном режиме (градиент "4000").

Таблица 7. Экспериментальные и вычисленные значения V_R для температуры 60 °С в линейном градиенте концентрации ацетонитрила "4000".

Название веществ	T=60 ºС		
	$V_{R\text{эксп}}$, мкл	$V_{R\text{выч}}$, мкл	Δ, %
Парацетамол	692	696	0,6
4-Гидроксибензойная кислота	776	780	0,5
3-Нитроанилин	1081	1086	0,5
Бензойная кислота	1191	1197	0,5
2-Нитроанилин	1349	1356	0,5
2-Нитрофенол	1503	1510	0,5
4-Нитротолуол	1960	1970	0,5
Нафталин	2403	2415	0,5
Пирен	3012	3027	0,5

Сравнение экспериментальных и вычисленных значений объемов удерживания для температуры 60 °С и 50 °С в сложном градиенте концентрации ацетонитрила, а также погрешности, вычисленных значений V_R приведено в табл. 8.

Таблица 8. Экспериментальные и вычисленные значения V_R для температуры 60 °С и 50 °С в сложном градиенте концентрации ацетонитрила.
Элюенты: **А** - 0,2 М $LiClO_4$ - 0,005 М $HClO_4$, **Б** - ацетонитрил; градиент: 600 мкл от 0 до 20% **Б**; 400 мкл 20% **Б**; 600 мкл от 20 до 40% **Б**; 900 мкл от 40 до 100% **Б**.

Название веществ	T=60 ºС			T=50 ºС		
	$V_{R\text{эксп}}$, мкл	$V_{R\text{выч}}$, мкл	Δ, %	$V_{R\text{эксп}}$, мкл	$V_{R\text{выч}}$, мкл	Δ, %
Парацетамол	620	635	2,4	710	687	3,2
4-Гидроксибензойная кислота	690	701	1,6	794	772	2,8
3-Нитроанилин	987	1009	2,2	1096	1074	2,0
Бензойная кислота	1110	1139	2,6	1226	1206	1,6
2-Нитроанилин	1338	1357	1,4	1492	1512	1,3
2-Нитрофенол	1515	1533	1,2	1630	1608	1,4
4-Нитротолуол	1932	1947	0,8	1989	2013	1,3
Нафталин	2167	2184	0,8	2206	2233	1,2
Пирен	2426	2448	0,9	2465	2493	1,1

Сравнение экспериментальных и вычисленных значений V_R (табл. 7 и 8) показывает, что в линейном градиенте различия между ними достигают не более 1%, а в градиенте сложной формы – не более 4%.

4.5. Влияние скорости потока элюента на ширину хроматографического пика

Скорость потока подвижной фазы является важным оптимизационным параметром в жидкостной хроматографии. С одной стороны она прямо определяет продолжительность анализа, а с другой – влияет на эффективность колонки, то есть на ширину пика, что, в свою очередь, влияет на разрешение пиков (R_S), определяемое по уравнению (22). Когда величина R_S выбирается в качестве параметра оптимизации, влияние скорости потока необходимо учитывать количественно. Связь эффективности колонки со скоростью потока при изократическом элюировании описывается уравнением Ван-Деемтера, графически представленном на рис. 3. Возможность применения уравнения Ван-Деемтера для градиентной хроматографии остается под вопросом – нам не удалось найти по этому поводу никакой информации в литературе.

Экспериментальные зависимости H от u (и F) для пяти веществ приведены на рис. 17. Здесь обращает на себя внимание то, что в области скоростей потока от оптимальной скорости $u > 0{,}5$ мм/с и выше ($F > 100$) зависимость величины H практически линейна:

$$H \approx A_u \cdot u + B_u, \tag{31}$$

где A_u и B_u – константы.

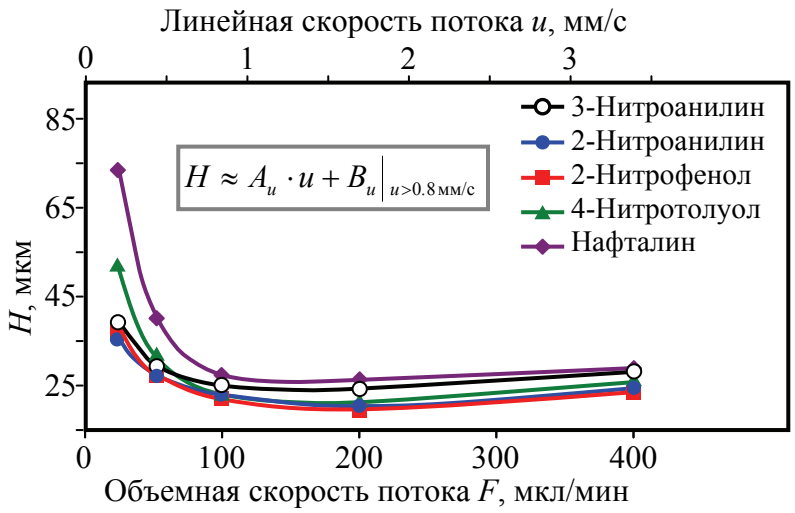


Рис. 17. Зависимости величины H от скорости потока подвижной фазы. Элюенты: **А** - 0,2 М $LiClO_4$ - 0,005 М $HClO_4$, **Б** - ацетонитрил; градиент от 0 до 100% **Б** (3000 мкл); скорость потока: 25, 50, 100, 200, 400 мкл/мин; температура: 40 °С.

Отметим, что в программах, эмулирующих хроматограммы в градиентном режиме, эффективность колонки принимается постоянной при всех скоростях потока. Это приводит к весьма значительной погрешности при вычислении величин $w_{1/2}$. Например,

сравнение экспериментально полученных значений $w_{1/2}$ с вычисленными в программе-тренажере "Жидкостный хроматограф" (*v.* 1.2) приведено в табл. 9, где погрешность вычисления значений $w_{1/2}$ относительно экспериментальных данных достигает 80%. В тренажере (*v.* 1.3), где зависимость величины H от F учитывается согласно уравнению (31), величина погрешности снижена до 8% (см. табл. 9).

Таблица 9. Сравнение ширин пиков веществ от скорости потока элюента в экспериментальных и эмулированных хроматограммах.
Линейный градиент от 0 до 100% ацетонитрила (3000 мкл), F = 200 мкл/мин, N = 6000 т.т., T = 40 °С. Величину $w_{1/2}$ вычисляли по уравнению (19).

Вещество	Экспер.	Тренажер, *v.* 1.2		Тренажер, *v.* 1.3	
	$w_{1/2}$, мкл	$w_{1/2}$, мкл	Δ, %	$w_{1/2}$, мкл	Δ, %
3-Нитроанилин	20	16	25	19	5
2-Нитроанилин	21	13	62	20	5
2-Нитрофенол	23	15	53	22	5
4-Нитротолуол	27	15	80	25	8

Отметим, что программа *ACD LC Simulator* [3], как и Тренажер (*v.* 1.2), не учитывает зависимость H от F, что с очевидностью следует из табл. 10.

Таблица 10. Ширины пиков при разных скоростях потока в хроматограммах, эмулированных в программе *ACD LC Simulator*. Градиент: от 0 до 100% Б (4000 мкл).

Вещество	w, мкл	
	F = 50 мкл/мин	F = 400 мкл/мин
Теобромин	18	18
Кофеин	17	17
2,4-Динитрофенол	23	23
Бензанилид	21	21
1-Нафтол	25	24
4-Нитротолуол	24	24
1-Нитронафталин	27	26

4.6. Оптимальный метод определения констант, необходимых для эмулирования хроматограмм

В итоге, нами был разработан алгоритм, позволяющий из минимального числа предварительных экспериментов – 4 градиентные хроматограммы – находить необходимые константы, позволяющие эмулировать хроматограммы для разных условий и, тем самым, подбирать оптимальные условия.

Во-первых, для оптимизации формы градиента, необходимо записать две хроматограммы в линейных градиентах концентрации ацетонитрила с разными углами наклона градиента.

Во-вторых, для учета влияния температуры колонки нужно записать две хроматограммы при разных температурах.

В-третьих, для учета влияния скорости потока элюента достаточно записать две хроматограммы при разных скоростях потока.

Комбинация всех этих условий для хроматографа "Милихром А-02" с колонкой 2x75 мм (*ProntoSIL*-120-5-*C*18) сводится к следующим четырем экспериментам:

I. Градиент "2000"; температура колонки:40 °C; скорость потока: 150 мкл/мин

II. Градиент "4000"; температура колонки:40 °C; скорость потока: 150 мкл/мин

III. Градиент "4000"; температура колонки:60 °C; скорость потока: 150 мкл/мин

IV. Градиент "4000"; температура колонки:40 °C; скорость потока: 400 мкл/мин

4.7. Апробация разработанного метода нахождения констант для эмулирования хроматограмм

Разработанные алгоритмы для оптимизации микроколоночной ОФ ВЭЖХ были апробированы на следующих примерах:

- определение констант для веществ, входящих в состав тренажера "Жидкостный хроматограф";
- оптимизация методики определения диэфиров фталевой кислоты;
- методика определения вещества "Аналит" в водном экстракте коры осины;
- оптимизация методики анализа лекарственного средства "Цитрамон-П".

4.7.1. Определение констант для веществ, входящих в состав компьютерного тренажера "Жидкостный хроматограф"

Для всех 30 веществ, входящих в состав компьютерного тренажера, были рассчитаны необходимые константы по предложенному методу. Вещества были разбиты на 4 группы и для каждой были записаны по 4 хроматограммы. Хроматограммы для одной из групп веществ приведены на рис. 18. Значения констант для всех 30 веществ приведены в Приложении 2 и введены в программу-тренажер "Жидкостный хроматограф".

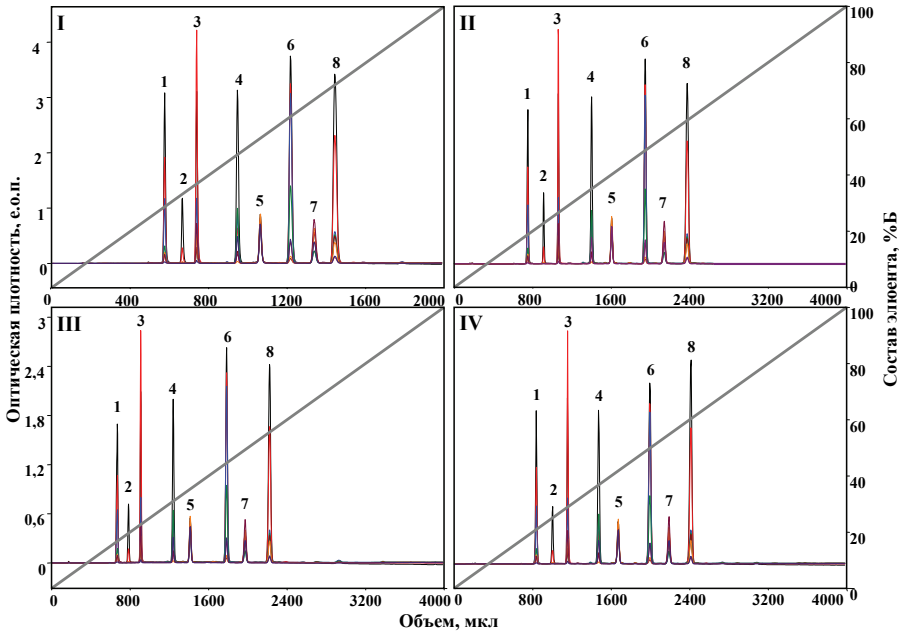


Рис. 18. Хроматограммы стандартного раствора.
Элюенты: **А** - 0,2 М $LiClO_4$ - 0,005 М $HClO_4$, **Б** - ацетонитрил; объем пробы: 2 мкл; детектирование при длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм. Пики на хроматограмме: 1- йодид-ион; 2- сахарин; 3- теофиллин; 4- 3-гидроксибензойная кислота; 5- новокаин; 6- ацетилсалициловая кислота; 7- 4-нитробензойная кислота; 8- бензанилид.

4.7.2. Методика определения диэфиров фталевой кислоты

Диэфиры фталевой кислоты являются экотоксикантами, контролируемыми в окружающей среде [38]. Хроматограмма диэфиров в изократическом режиме приведена на рис. 19. Время анализа составляет 24 минуты.

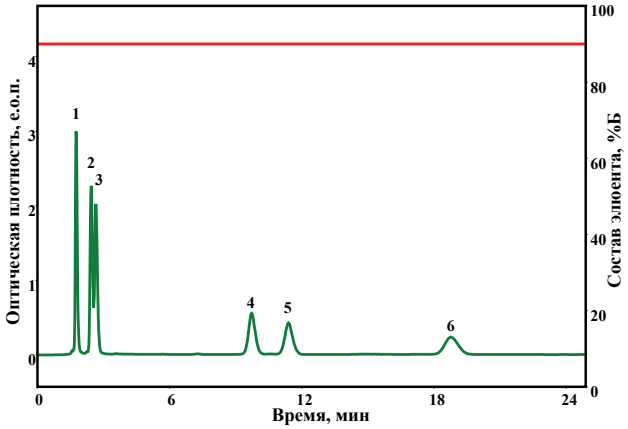


Рис. 19. Хроматограмма диэфиров фталевой кислоты.
Элюенты: **А** - 0,2 М $LiClO_4$ - 0,005 М $HClO_4$, **Б** - ацетонитрил; подвижная фаза 90% **Б**; объем пробы: 2 мкл; скорость потока: 100 мкл/мин; температура колонки: 40 °С; детектирование при длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм. Пики на хроматограмме: 1- ди-метил-, 2- ди-*н*-бутил-, 3- *бис*(2-этилгексил)-, 4- *н*-бутилбензил-, 5- ди-*н*-октил-, 6- ди-*н*-нонилфталат.

Используя разработанный нами метод оптимизации, мы ускорили разделение. Были записаны 4 хроматограммы, приведенные на рис. 20. Из них с помощью

вычислительной программы были найдены необходимые константы, позволяющие эмулировать хроматограммы для любой формы градиента, температуры и скорости потока, после чего оптимизировали условия хроматографирования.

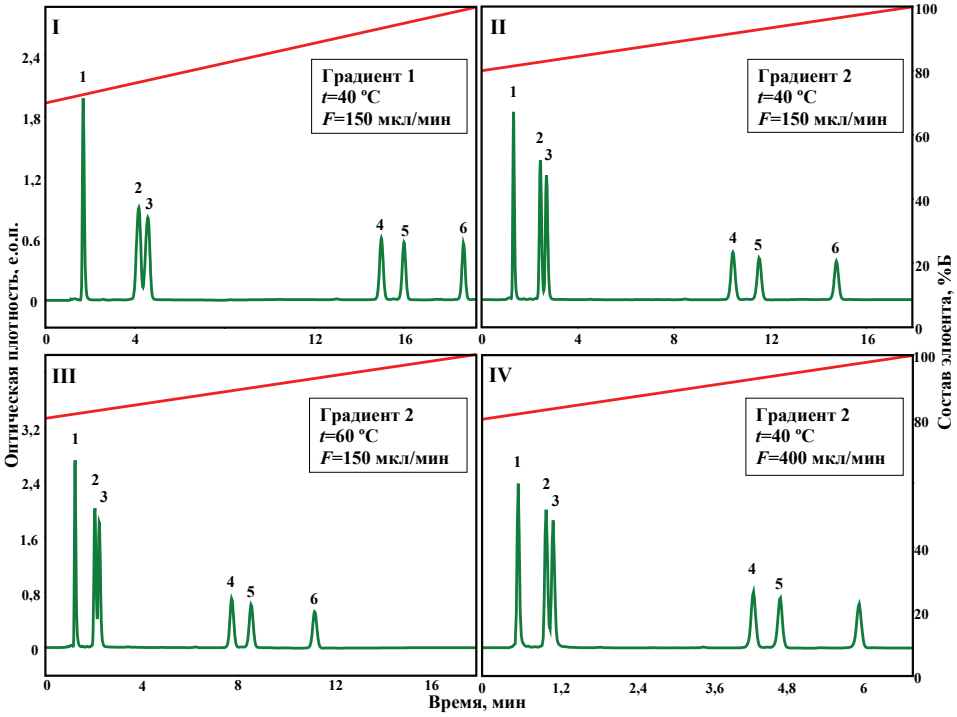


Рис. 20. Хроматограммы диэфиров фталевой кислоты.
Элюенты: **А** - 0,2 М $LiClO_4$ - 0,005 М $HClO_4$, **Б** - ацетонитрил; объем пробы: 2 мкл; детектирование и идентификация пиков как на рис. 19.

На рис. 21 приведена оптимальная хроматограмма для диэфиров фталевой кислоты, из которой видно, что время анализа сократилось до 7 мин. $R_{S\text{мин}}$ не меньше 1,5.

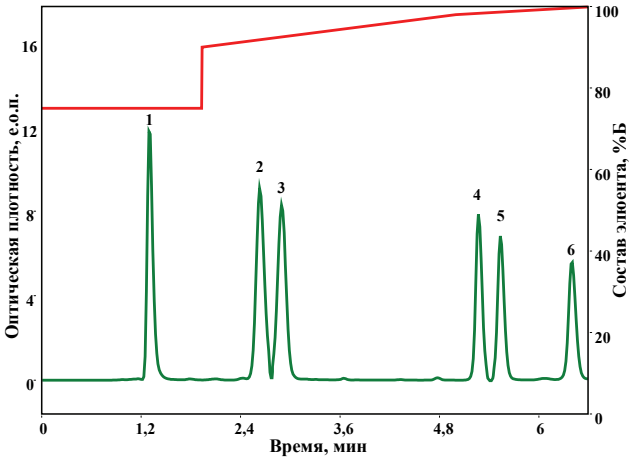


Рис. 21. Оптимальная хроматограмма диэфиров фталевой кислоты.
Элюенты: **А -** 0,2 М $LiClO_4$ - 0,005 М $HClO_4$, **Б** - ацетонитрил; градиент: 800 мкл 75% **Б**; 1200 мкл от 90 до 98% **Б**; 800 мкл 100% **Б**. F = 400 мкл/мин. Т = 60 °С; детектирование при длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм. Объем пробы: 2 мкл. Идентификация пиков как на рис. 19.

4.7.3. Методика определения вещества "Аналит" в водном экстракте коры осины

Проверка пригодности разработанного алгоритма оптимизации градиента проиллюстрирована на примере определения неизвестного соединения ("аналит") в сложной смеси веществ – водный экстракт коры осины. В качестве вещества-аналита мы выбрали вещество "2" на хроматограмме (рис. 22), которое необходимо определить в смеси количественно. Очевидно, что его надо отделить от всех соединений, находящихся на хроматограмме и справа, и слева. Соседними веществами являются вещества "1" и "3". Аналитическая задача формулируется следующим образом: изменяя форму градиента, отделить вещество 2 от веществ 1 и 3 с разрешением $R_S > 1{,}5$ за минимальное время.

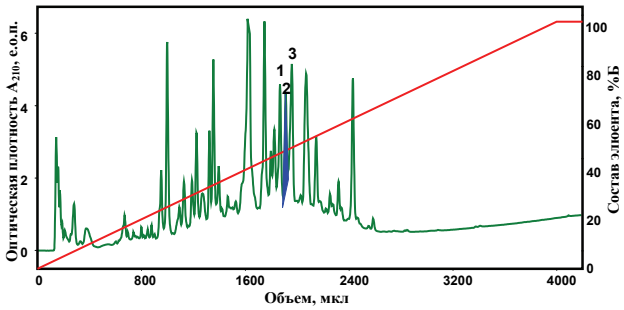


Рис. 22. Хроматограмма водного экстракта коры осины.
Элюенты: **А** - вода, **Б** - метанол; объем пробы: 4 мкл; скорость потока: 100 мкл/мин; температура: 40 °С; детектирование при длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм.

Были записаны две хроматограммы в линейных градиентах (2000 и 4000 мкл) от 0 до 100% Б. Из них для пиков 1, 2 и 3 определили объемы удерживания, после чего для каждого вещества вычислили константы k'_0 и n. Константы ввели в программу "Оптимизатор" и получили возможность эмулировать хроматограммы для разных градиентов концентрации метанола в подвижной фазе, и, тем самым, подбирать оптимальные условия элюирования, передвигая курсором мыши узловые точки на градиентной кривой (рис. 23-I). Для каждой эмулированной хроматограммы программа вычисляла значения R_S.

Из хроматограммы, приведенной на рис. 23-I, видно, что для полученной формы градиента время разделения сократилось до 15 мин, а $R_{S\text{мин}}$ составило 1,5.

Экспериментальная хроматограмма приведена на рис. 23-II. Из нее видно, что полученные результаты хорошо совпадают с предсказанными.

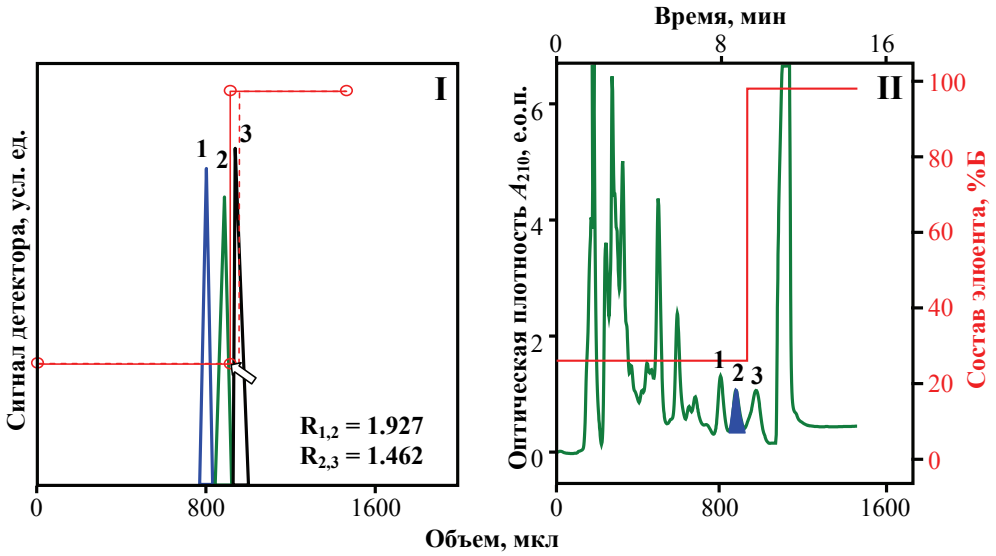


Рис. 23. Эмулированная хроматограмма веществ 1, 2 и 3 (**I**) и экспериментальная хроматограмма экстракта коры осины (**II**).
Элюенты: **А** - вода, **Б** – метанол. Элюция: 1000 мкл 25% **Б**; 500 мкл 100% **Б**. Объем пробы: 4 мкл; скорость потока: 100 мкл/мин; температура: 40 °С; детектирование при длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм.

4.7.4. Оптимизация методики анализа лекарственного средства "Цитрамон-П".

В фармакопейном анализе ВЭЖХ применяется, главным образом, для определения микропримесей. Анализы выполняются по методикам, включенным в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФРФ). В настоящее время в РФ действует ГФРФ XII [39].

Для апробации разработанных нами алгоритмов оптимизации мы выбрали многокомпонентное лекарственное средство "Цитрамон-П". "Цитрамон-П" в ГФРФ XII пока не включен, а Фармакопейная статья предприятия на "Цитрамон-П" нам не доступна. Поэтому мы анализировали его по аттестованной методике [40]. Хроматограмма приведена на рис. 24А. Идентификация веществ на хроматограмме и определение их количественного содержания проведено по базе данных "БД-2003" [40]. Результаты анализа приведены в подписи к рис. 24. Они подтверждают состав лекарственного средства и соответствуют допустимым отклонениям в концентрациях каждой субстанции, регламентированным Общей фармакопейной статьей "ОФС 42-0130-09" [39].

В лекарственном средстве присутствует примесь (салициловая кислота), содержание которой в таблетке "Цитрамона-П" составило 4 мг, что соответствует 0,8%. Этот показатель для таблеток не нормирован в ГФРФ, а задан в Фармакопейной статье предприятия. Для справки отметим, что количество салициловой кислоты в таблетках, содержащих парацетамол, кофеин и ацетилсалициловую кислоту, согласно Фармакопее США [41] не должно превышать 3%.

Продолжительность анализа "Цитрамона-П" по методике [40] составила 15 мин (рис. 24А). Для ускорения анализа мы провели оптимизацию с помощью программы-тренажера "Жидкостный хроматограф" [36], в состав которой все компоненты "Цитрамона-П", включая салициловую кислоту, уже включены. В качестве параметра оптимизации выбирали разрешение двух рядом стоящих пиков на хроматограмме, которое не должно быть менее 2. В результате оптимизации время анализа сократилось до 1,5 мин, т.е. в десять раз (рис. 24Б).

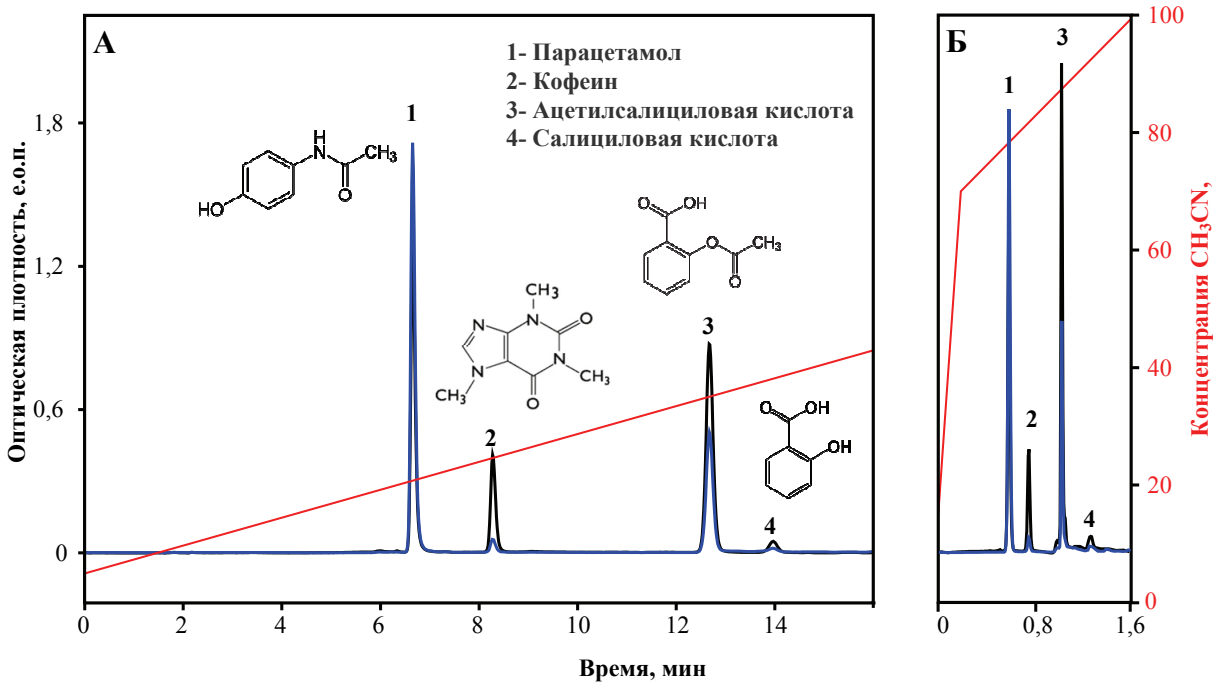


Рис. 24. Хроматограммы лекарственного средства "Цитрамон-П"
А - хроматограмма по методике [40]; **Б** - оптимальная хроматограмма.

Параметр оптимизации	Рис. 24А	Рис. 24Б
Градиент	4000 мкл от 5 до 100% Б	80 мкл от 15 до 70% Б; 620 мкл от 70 до 100% Б
T, ºС	40	80
F, мкл/мин	100	400

Идентификация пиков на хроматограмме (в скобках указано найденное количество вещества в одной таблетке "Цитрамона-П", вес которой равен 500 мг):

1 – парацетамол (158 ± 16 мг)
2 – кофеин (26 ± 3 мг)
3 – ацетилсалициловая кислота (225 ± 23 мг)
4 – салициловая кислота (4 мг).

5. ВЫВОДЫ

1. Модифицирована конструкция смесителя градиентного насоса хроматографа "Милихром А-02". Объем задержки градиента уменьшен с 290 до 36 мкл.

2. Реализован и апробирован алгоритм нахождения констант (k'_0 и n), необходимых для эмулирования градиентной обращенно-фазовой ВЭЖХ, из двух градиентных хроматографий. Погрешность предсказания объемов удерживания веществ с использованием найденных констант не превышает 6% от экспериментальных.

3. Показано, что в градиентной обращенно-фазовой ВЭЖХ в диапазоне температур 35-80 ºС логарифм объема удерживания вещества линейно связан с обратной температурой. Различие объемов удерживания веществ в экспериментальных и в эмулированных хроматограммах не превышает 4%.

4. Показано, что в градиентной обращенно-фазовой ВЭЖХ при скоростях потока подвижной фазы равной или превышающей оптимальную скорость потока высота теоретической тарелки линейно увеличивается при возрастании скорости потока. Различие ширин пиков веществ в экспериментальных и в эмулированных хроматограммах в диапазоне скоростей потока 100-800 мкл/мин не превышает 8%.

5. Разработан алгоритм нахождения констант, определяющих хроматографические свойства веществ в градиентной ОФ ВЭЖХ при изменении параметров градиента, температуры и скорости элюции, требующих четыре хроматографических эксперимента.

6. Разработанный алгоритм нахождения констант апробирован при оптимизации методик анализа диэфиров фталевой кислоты, водного экстракта коры осины, лекарственного средства "Цитрамон-П" и для характеризации 30 веществ, входящих в состав компьютерного тренажера "Жидкостный хроматограф".

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saeks, J. Liquid chromatography. Market Intelligence Report // Kalorama Information. - New York, 2009. - P. 1.
2. http://www.molnar-institut.com/HP/Software/DryLab.php
3. http://www.acdlabs.com/products/com_iden/meth_dev/lc_sim/
4. http://www.chromsword.com/en/products/
5. Saeks, J. Liquid chromatography. Market Intelligence Report // Kalorama Information. - New York, 2009. - P. 56.
6. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Dolan, J.W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. - John Wiley&Sons, Ltd, Chichester, 2010. - 3 ed. – P. 26.
7. Jandera, P., Churacek, J. Gradient Elution in Column Liquid Chromatography // Journal of Chromatography Library -1985. – Vol. 31. – P. 15-19.
8. Snyder, L.R., Dolan, J.W. High-Performance Gradient Elution. The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model. - John Wiley&Sons, Ltd, Chichester, 2007. – P. 13-18.
9. [7]. - P. 59-142.
10. Kazakevich, Y. HPLC for Pharmaceutical Scientists / Eds Lobrutto, R. - John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007. - P. 503-532.
11. Quarry, M.A., Snyder, L.R. Computer simulation in HPLC method development. Reducing the error of predicted retention times // J. Liquid Chromatogr., 1987. - Vol. 10. № 8&9. – P. 1789-1820.
12. Quarry, M.A., Grob, R.L., Snyder, L.R. Measurement and use of retention data from high-performance gradient elution. Correction "non-ideal" processing originating within column // J. Chromatogr., 1984. - Vol. 285. – P. 19-51.
13. Quarry, M.A., Grob, R.L., Snyder, L.R. Prediction of precise isocratic retention data from two or more gradient elution runs. Analysis of some associated errors // Anal. Chem., 1986. – Vol. 58. – P. 907-917.
14. Schoenmakers, P.J. Optimization of Chromatographic Selectivity. A guide to method development // Journal of Chromatography Library -1986. – Vol. 35. – P. 68.
15. Wolcott, R.G., Dolan, J.W., Snyder, L.R. Computer simulation for the convenient optimization for isocratic reversed-phase liquid chromatographic separations by varying temperature and mobile phase strength // J. Chromatogr. A, 2000. - № 869. - P. 3-25.
16. Gant, J.R., Dolan, J.W., Snyder, L.R. Systematic approach to optimizing resolution in reversed phase liquid chromatography, with emphasis on the role of temperature // J. Chromatogr., 1979. - № 185. – P. 153-177.
17. Schoenmakers, P.J. Optimization of Chromatographic Selectivity. A guide to method development // Journal of Chromatography Library -1986. – Vol. 35. – P. 69-74.
18. [7]. – P. 80-92.
19. [7]. – P. 101-108.
20. Jandera, P., Churacek, J. Gradient elution in liquid chromatography. II. Retention characteristics (retention volume, band width, resolution, plate number) in solvent-

programmed chromatography - theoretical considerations // J. Chromatogr., 1974. - № 91. – P. 223-235

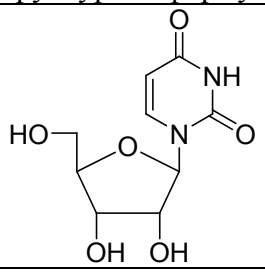
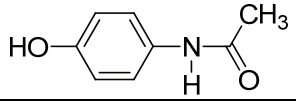
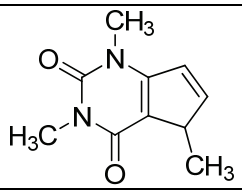
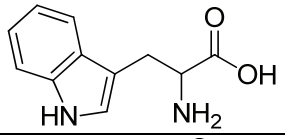
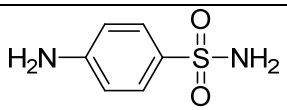
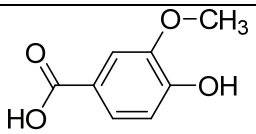
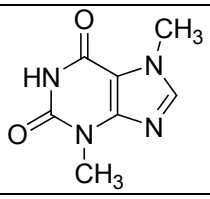
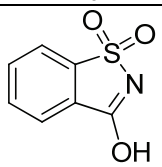
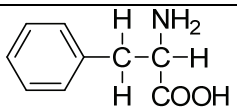
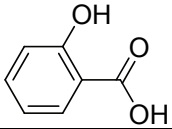
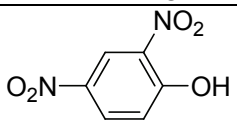
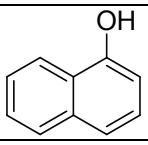
21. Liang, H., Liu, Y. Recursion equations in predicting band width under gradient elution // J. Chromatogr. A, 2004. - № 1040. – P. 19-31.
22. Сычев, К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии / Под ред. А.А. Курганова - Москва: Техносфера, 2010. - 123-127 с.
23. Halasz, I., Endele, R., Asshauer, J. Ultimate limits in high-perfomance liquid chromatography // J. Chromatogr., 1975. - № 112. - P. 37-60.
24. Halasz, I., Schmidt, H., Vogtel, P. Particle size, pressure and analysis time in routine high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr., 1976. - № 126. - P. 19-33.
25. Katz, E., Ogan, K.L., Scott, R.P.W. Peak dispersion and mobile phase velocity in liquid chromatography: the pertinent relationship for porous silica // J. Chromatogr., 1983. - № 270. - P. 51-75.
26. Stout, R.W., DeStefano, J.J., Snyder, L.R. High-perfomance liquid chromatographic column efficiency as a function of particle composition and geometry and capacity factor // J. Chromatogr., 1983. - № 282. - P. 263-286
27. McCalley, D.V. Effect of temperature and flow-rate on analysis of basic compounds in high-perfomance liquid chromatography using a reversed-phase column // J. Chromatogr. A, 2000. - № 902. - P. 311-321.
28. Wirth, M.J., Smith, E.A., Anthony, S.R. Measurement and simulation tailing zones of a cationic dye in analytical-scale reversed phase chromatography // J. Chromatogr. A, 2004. - № 1034. - P. 69-75.
29. Pan, L., LoBrutto, R., Kazakevich, Y., Thompson, R. Influence of inorganic mobile phase additives on the retention, efficiency and peak symmetry of protonated basic compounds in reversed-phase liquid chromatography // J. Chromatogr. A, 2004. - № 1049. - P. 63-73.
30. Molnar, I. Computer design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software (Review) // J. Chromatogr. A, 2002. - № 965. - P. 175–194.
31. Snyder, L.R., Dolan, J.W., Lommen, D.C. DryLab® computer simulation for high performance liquid chromatographic method development. I. Isocratic elution // J. Chromatogr., 1989. - № 485. - P. 65-89.
32. Dolan, J.W., Lommen, D.C., Snyder, L.R. DryLab® computer simulation for highperformance liquid chromatographic method development. II. Gradient elution // J. Chromatogr., 1989. - № 485. - P. 91-112.
33. Molnar, I., Rieger, H.-J., Kormany, R. Chromatography Modelling in High Performance Liquid Chromatography Metod Development // Chromatography Today, 2013. - Vol.6. №1. - P. 3-8.
34. Vogel, F., Galushco, S. Application of ChromSword Software for Automatic HPLC Method Development and Robustness Studies. Separation of Terbinafine and Impurities // Chromatography Today, 2013. - Vol.6. №1. - P. 10-12.
35. Adams, D.C., Bhal, S.K. How Software Can Aid Decision-Making in Chromatographic Method Development // Chromatography Today, 2013. - Vol.6. №1. - P. 22-24.
36. Барам, Г.И., Азарова, И.Н., Петков, А.П., Рябичев, Д.А., Барам, Е.Г., Каламбет, Ю.А., Козьмин, Ю.П., Мальцев, С.А., Михайлова, К.В. Компьютерная программа-

тренажер "Жидкостный хроматограф" v.1.2 // Руководство к учебному пособию для студентов ВУЗов, обучающихся по направлению ВПО 029100 –"химия", ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", Новосибирск, 2013, С. 47 (http://www.econova.ru/applications/production/production.php?set=trenager&id=).

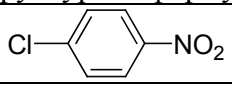
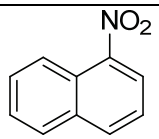
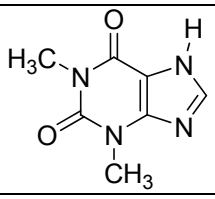
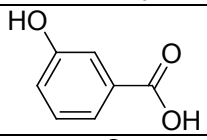
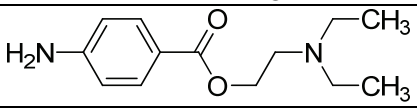
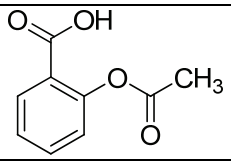
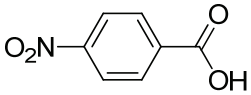
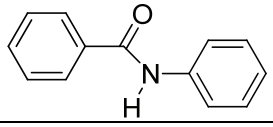
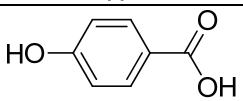
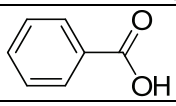
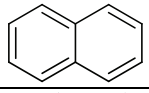
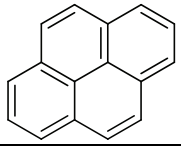
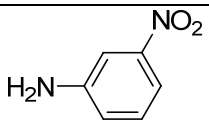
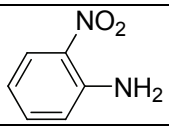
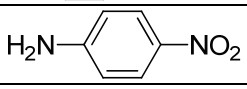
37. Kazakevich, Y. HPLC for Pharmaceutical Scientists / Eds Lobrutto, R. - John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007. - P. 778-802.
38. Nollet, L.M.L. Hanbook of water analysis. / Taylor & Francis Group, L.L.C., Boca Raton, 2007. - 2nd ed. – P. 729-740.
39. Государственная фармакопея российской федерации XII // М:, Издательство "Научный центр экспертизы средств медицинского применения", Часть 1, 2008, 704 с; Часть 2, 2010, 854 с.
40. Массовая концентрация УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом ВЭЖХ // Федеральный реестр методик выполнения измерений, применяемых в сферах распространения государственного метрологического контроля и надзора, 2003, № ФР.1.31.2003.00950. – С – 11.
41. US Pharmacopeia 32 // The United States Pharmacopeial Convention, 2008. – P. 14-15.

Приложение 1

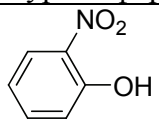
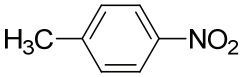
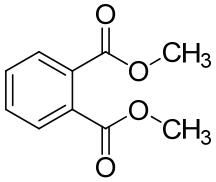
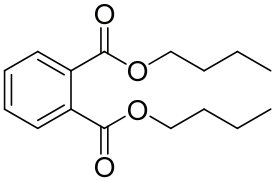
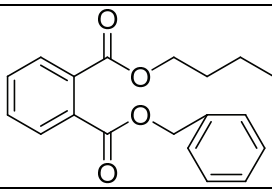
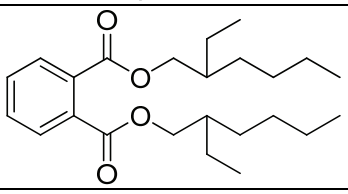
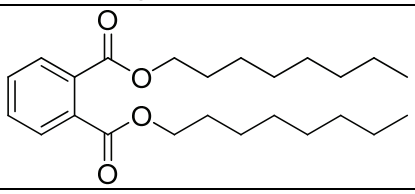
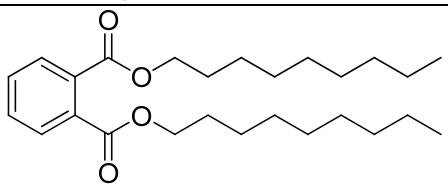
Вещества-аналиты

№	Вещество	Структурная формула
1	Уридин	
2	Парацетамол	
3	Кофеин	
4	Триптофан	
5	Стрептоцид	
6	Ванилин	
7	Теобромин	
8	Сахарин	
9	Фенилаланин	
10	Салициловая кислота	
11	2,4-Динитрофенол	
12	1-Нафтол	

Приложение 1

№	Вещество	Структурная формула
13	4-Нитрохлорбензол	
14	1-Нитронафталин	
15	Теофиллин	
16	3-Гидроксибензойная кислота	
17	Новокаин	
18	Ацетилсалициловая кислота	
19	4-Нитробензойная кислота	
20	Бензанилид	
21	4-Гидроксибензойная кислота	
22	Бензойная кислота	
23	Нафталин	
24	Пирен	
25	3-Нитроанилин	
26	2-Нитроанилин	
27	4-Нитроанилин	

Приложение 1

№	Вещество	Структурная формула
28	2-Нитрофенол	
29	4-Нитротолуол	
30	Йодид калия	*KI*
31	Диметилфталат	
32	Ди(*н*-бутил)фталат	
33	*н*-Бутилбензилфталат	
34	*бис*(2-Этилгексил)фталат	
35	Ди-*н*-октилфталат	
36	Ди-*н*-нонилфталат	

Приложение 2

Значения констант для исследованных веществ

A_T и B_T – константы в уравнении (30) для градиентной элюции.
H_{150} и H_{400} – высота теоретической тарелки при F = 150 мкл/мин и F = 400 мкл/мин.

№	Название	k'_0(40 °C)	n	A_T	B_T	H_{150}	H_{400}
1	1-Нафтол	159,3	0,0396	6554,6	-15,87	11,79	23,85
2	1-Нитро-4-хлорбензол	152,5	0,0340	1753,3	-0,57	15,77	16,80
3	1-Нитронафталин	317,3	0,0367	1689,3	0,36	25,47	21,51
4	2,4-Динитрофенол	52,73	0,0344	2111,7	-2,78	6,73	12,91
5	2-Нитроанилин	38,26	0,0321	1203,9	-0,21	5,95	6,02
6	2-Нитрофенол	45,01	0,0305	1033,2	0,51	7,11	8,97
7	3-Гидроксибензойная кислота	16,78	0,0427	2000,9	-3,57	1,23	3,43
8	3-Нитроанилин	16,28	0,0259	655,37	0,70	5,53	7,01
9	4-Гидроксибензойная кислота	10,57	0,0349	880,79	-0,46	0,90	6,03
10	4-Нитротолуол	141,8	0,0343	1221,6	1,05	13,96	14,57
11	Ацетилсалициловая кислота	38,19	0,0435	1604,5	-1,48	3,21	9,07
12	Бензанилид	157,3	0,0397	1703,4	-0,38	11,89	22,36
13	Бензойная кислота	29,62	0,0360	774,29	0,92	3,46	4,85
14	Ванилин	17,36	0,0339	1857,4	-3,08	1,82	4,14
15	Кофеин	12,69	0,0406	2028,7	-3,94	0,18	1,63
16	Нафталин	327,2	0,0339	1314,5	1,59	32,28	15,27
17	Новокаин	21,85	0,0442	1986,3	-3,26	5,85	9,45
18	Парацетамол	18,81	0,0787	683,70	0,75	8,37	30,43
19	Пирен	946,7	0,0325	1595,0	1,76	28,04	13,51
20	Салициловая кислота	38,51	0,0370	1937,0	-2,54	4,92	10,53
21	Сахарин	8,91	0,0459	1414,4	-2,33	5,45	10,27
22	Теобромин	9,17	0,0544	-52,76	2,39	0,06	0,48
23	Теофиллин	14,13	0,0608	1502,0	-2,15	1,13	5,40
24	Триптофан	25,85	0,0490	2497,5	-4,73	1,84	4,71
25	Уридин	3,10	0,0149	7191,2	-21,85	14,05	27,32
26	Фенилаланин	14,47	0,0450	2033,2	-3,82	1,56	7,77
27	Диметилфталат	31,17	0,0257	1361,2	-0,91	6,24	29,96
28	Ди(*н*-бутил)фталат	811,7	0,0343	1487,2	1,95	8,38	18,84
29	*н*-Бутилбензилфталат	814,5	0,0334	1513,5	1,87	8,21	16,44
30	*бис*-(2-Этилгексил)фталат	115000	0,0478	2611,5	3,31	8,27	11,66
31	Ди(*н*-октил)фталат	140460	0,0479	2733,4	3,12	8,13	10,64
32	Ди(*н*-нонил)фталат	78758000	0,0759	3853,0	5,87	13,63	20,47