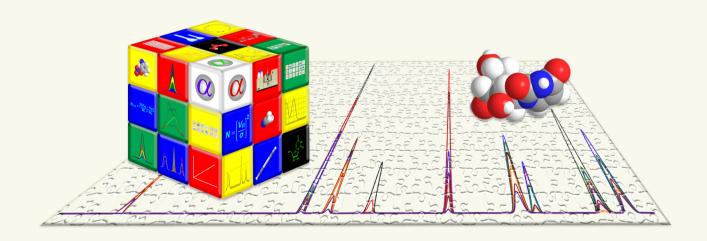
Практикум по ВЭЖХ на виртуальном хроматографе



Г. И. Барам, Е. Г. Барам

Практикум по ВЭЖХ на виртуальном хроматографе

Новосибирск 2015 г.

Г. И. Барам, Е. Г. Барам. Практикум по ВЭЖХ на виртуальном хроматографе.

Г. И. Барам, 2015. – 90 с., **ISBN 978-5-600-01120-5**

Практикум по ВЭЖХ основан на использовании компьютерной программы-тренажера "Виртуальный жидкостный хроматограф", которая является результатом развития программы "Жидкостный хроматограф", допущенной в 2012 г. Учебно-методическим объединением Московского государственного университета по классическому университетскому образованию в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению ВПО 020100 – "химия" и специальности ВПО 020201 – "фундаментальная и прикладная химия".

Практикум предназначен для закрепления полученных на лекциях теоретических знаний в области высокоэффективной жидкостной хроматографии путем решения типовых аналитических задач на виртуальном хроматографе. Материал изложен таким образом, что его можно изучать самостоятельно, а занятия в рамках Практикума – проводить в режиме дистанционного обучения.

ISBN 978-5-600-01120-5



- © ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", 2015 г.
- © Г. И. Барам, Е. Г. Барам, 2015 г.

ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова"

630090, Новосибирск, Академгородок, ул. Инженерная, д. 28

Тел./факс: 8 (383) 207 84 71 Эл. почта: info@econova.nsk.su Сайт: www.econova.ru

Содержание

Предисловие, которое надо прочитать	6
О Практикуме	
В. А. Даванков	9
С. М. Староверов	10
Описание Тренажера	
1. Главное окно Тренажера	12
2. Окно "Схема хроматографа"	13
3. Окно "Характеристики хроматографа"	14
4. Мастер подготовки образца: окно "Выбор веществ для образца"	15
5. Мастер подготовки образца: окно "Приготовление образца"	16
6. Окно "Автодозатор"	18
7. АльфаХром-Т: окно "Настройки хроматографа"	19
8. АльфаХром-Т: окно "Ручные операции"	20
9. АльфаХром-Т: окно "Эксперимент"	21
10. АльфаХром-Т: трансформирование хроматограммы на экране	23
11. АльфаХром-Т: сравнение хроматограмм	24
12. АльфаХром-Т: ускорение анализа	25
13. Идентификация пиков веществ методом внешнего стандарта	26
14. Идентификация пиков веществ методом добавки	30

Содержание (продолжение)

15. Идентификация пиков веществ по спектральным отношениям	31
16. Идентификация пиков веществ по Базе данных "ВЭЖХ-УФ"	32
17. Определение концентрации веществ в анализируемых растворах	34
18. Сравнение реальной и виртуальной жидкостной хроматографии	37
19. Градиентное элюирование	38
20. Программа "Оптимизатор градиента и температуры"	40
21. Программа "Генератор хроматограмм"	44
Приложения	
1. Жидкостный хроматограф "Милихром А-02"	46
2. Названия и структурные формулы веществ, включенных в состав Тренажера	47
3. Хроматографический пик	48
4. Хроматограмма. Удерживание вещества в колонке	49
5. Эффективность колонки, разрешение пиков, ассиметрия пиков	50
6. Принцип хроматографического анализа	51
7. Давление в ВЭЖХ	52
8. Вязкость водно-органических подвижных фаз	53
9. Фотометрическое детектирование	54
10. Высота и площадь хроматографического пика	56

Содержание (продолжение)

11. Многоканальное детектирование в ВЭЖХ. Базы данных "ВЭЖХ-УФ"	57
12. Обращенно-фазовая хроматография	60
13. Рекомендованная литература	
Основная литература	62
Дополнительная литература	63
Задачи	
1. Как величина фактора удерживания вещества зависит от силы элюента?	64
2. Связь фактора разделения ($lpha$) с эффективностью колонки (N) и разрешением пиков ($R_{ m S}$)	67
3. Предел чувствительности хроматографического анализа	70
4. Валидация хроматографической методики анализа	72
5. Определение концентрации кофеина в чае	75
6. Ввод вещества в Базу данных "ВЭЖХ-УФ"	82
Условные обозначения и сокращения	87

Предисловие, которое надо прочитать

Прогресс в области аналитической химии, дающий нам новые знания и открывающий новые перспективы, сопровождается совершенствованием существующих, появлением ранее неизвестных и постепенным отмиранием устаревших методов анализа. Главной движущей силой развития является, безусловно, Экономика, задающая направление и темп, а успех зависит от согласованных действий трех полноправных участников процесса — Науки, Промышленности и Образования. Недооценка важности любого из них приводит к торможению. В силу многих причин наиболее консервативным звеном цепи является Образование, задача которого — подготовка специалистов. Качество подготовки и необходимое количество квалифицированных специалистов определяет широту использования и, этим самым, экономическую привлекательность любого метода аналитической химии. В полной мере вышесказанное относится и к высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Жидкостная хроматография, которую в 1903 г. ввел в практику русский ботаник М. С. Цвет¹⁾, за более чем столетний период своего развития стала "третьей после взвешивания и измерения рН технологией в аналитической химии"²⁾. С этим утверждением, сделанным на основании обзора мирового рынка оборудования для аналитической химии, можно согласиться, можно поспорить, но, в целом, принижать значимость этого метода и его современного варианта – ВЭЖХ, никто не станет.

Подготовкой специалистов в области ВЭЖХ главным образом заняты кафедры аналитической химии университетов. Обучение осуществляется по традиционной схеме: сначала читается курс лекций, а затем полученные теоретические знания закрепляются при выполнении практических работ. Наибольшие трудности возникают на втором этапе, так как при организации практикума требуется решать весьма непростые проблемы:

- получение значительных средств для приобретения необходимого числа хроматографов и вспомогательного оборудования, а также для периодического обновления приборного парка;
- обеспечение текущего финансирования для технической поддержки оборудования и приобретения расходуемых материалов;
- обеспечение должного уровня заработной платы преподавателям, лаборантам и инженерам, которые должны подготавливать оборудование, проводить занятия и совершенствовать практикум в течение всего учебного года.

¹⁾ **Цвет М. С.** О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу. *Труды Варшавского общества Естествоиспытателей*. Год XIV (1903). Отделение Биологии. – Протокол №6. сс. 1-20.

²⁾ Saeks J. A Kalorama Information Market Intelligence Report. New York, Kalorama Information, 2009, p. 2.

- выделение достаточного объема учебных часов для полноценного практикума не в ущерб практическим занятиям по другим разделам аналитической химии;
- обеспечение равномерной загрузки приборов и преподавателей в течение учебного года, что особенно важно при малом числе студентов, характерном для небольших университетов.

Все вышеперечисленные проблемы так или иначе связаны с объемами выделяемого финансирования, которых, как известно, всегда не хватает. По этой причине практически все практикумы сводятся, в лучшем случае, к групповому обучению, когда 3-5 студентов за 4-6 часов на одном хроматографе решают сообща 2-3 простейшие задачи. Назвать это полноценным обучением, конечно, нельзя.

Тем не менее, выход из трудного положения есть. Он представляется нам в реализации практикума по ВЭЖХ не на реальных, а на виртуальных хроматографах. Привлечение информационных технологий в данном случае является не данью времени, а способом решения задачи "снижения затрат" без добавления учебных часов. Обоснованность этого подхода обусловлена, как минимум, двумя обстоятельствами:

- современные жидкостные хроматографы максимально автоматизированы, управляются компьютерами с помощью специальных программ, и обучение работе на них сводится, практически, к освоению программного обеспечения;
- современное состояние теории хроматографии позволяет с хорошей точностью предсказывать результаты анализа, т.е. эмулировать хроматограммы при изменении условий эксперимента в достаточно широких пределах.

Таким образом, программный комплекс, в основе которого лежат математические модели хроматографа и хроматографического процесса, включающий в себя управляющую программу, программу математической обработки хроматограмм и программу, эмулирующую хроматограммы, представляет собой виртуальный хроматограф. В отличие от реального хроматографа, он во много раз дешевле, не требует расходуемых материалов, ремонта и технического обслуживания, не загрязняет окружающую среду. Поскольку продолжительность виртуального хроматографического эксперимента составляет всего несколько секунд, количество анализов, которые может сделать студент в течение отведенного времени, измеряется десятками. Что особенно важно, обучение на виртуальном хроматографе нет необходимости делать групповым. Каждый студент получает персональное задание, и обучение превращается в индивидуальное, причем оно может быть и заочным.

Виртуальный хроматограф, используемый в настоящем Практикуме, эмулирует работу реального жидкостного хроматографа "Милихром A-02", основные характеристики которого приведены в *Приложении 1*. Он "выполняет" анализы методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке $\emptyset 2 \times 75$ мм с фазой ProntoSIL-120-5-C18 AQ. Градиентный насос хроматографа формирует подвижную фазу из двух растворов: $\mathbf{A} - 0.2$ M LiClO₄ = 0.005 M HClO₄; $\mathbf{E} - \mathbf{E}$ ацетонитрил. Данная версия виртуального хроматографа колонку и растворы \mathbf{A} и \mathbf{E} менять не позволяет.

Виртуальный хроматограф входит в состав Тренажера, в который включены также такие программные продукты, как "Мастер подготовки образцов", "Генератор хроматограмм" и "Оптимизатор градиента и температуры".

"Мастер подготовки образцов" позволяет готовить растворы из 30 веществ в широком диапазоне концентраций для последующего хроматографического анализа. Формулы этих соединений приведены в *Приложении* 2.

"Генератор хроматограмм" позволяет вычислять типичные хроматографические параметры для пиков веществ с задаваемыми значениями факторов удерживания, хроматографируемых на колонках с задаваемыми размерами и эффективностью. Результаты представляются в табличном виде и в виде хроматограмм.

"Оптимизатор градиента и температуры" предназначен для отображения хроматограмм, генерируемых сразу после изменения параметров градиента и значения температуры, что дает возможность быстро и в наглядной форме улучшать условия разделения.

Эффективное усвоение изложенного в данном Практикуме материала предполагает, что программный комплекс уже установлен на компьютере студента согласно инструкции, находящейся в папке с дистрибутивом. Студент, последовательно изучая раздел "Описание Тренажера" путем повторения действий и процедур, полностью и самостоятельно осваивает работу на хроматографе, а затем решает задачи, которые получает от преподавателя. Шесть типовых задач с решениями приведены в конце книги. В зависимости от напряженности учебной программы преподаватель может сократить объем материала, отметив соответствующие пункты в Содержании. На весь раздел "Описание Тренажера" студент обычно тратит не более двух часов.

Компьютерный тренажер "Виртуальный жидкостный хроматограф" существует в виде демонстрационной и полной версии. Демо-версия распространяется бесплатно. Она имеет ряд ограничений, о которых упоминается по мере изложения материала. Для превращения демо-версии в полную в *USB*-порт компьютера необходимо вставить **ключ**, который приобретается в ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова" (тел.: 8 (383) 207 84 70, эл. почта: info@econova.nsk.su). Перед запуском полной версии программы из папки *ChromaTrainer>* надо удалить файл *demo.key*. Дистрибутив демоверсии Тренажера находится на диске, прилагаемом к данной книге, или может быть загружен с сайта *www.econova.ru*.

"Практикум по ВЭЖХ на виртуальном хроматографе" в течение четырех лет апробировался на кафедре аналитической химии Новосибирского государственного университета. Продолжительность занятий со студентами 3-го курса в группах по 8-10 человек составляла 6 часов, практикум был сокращен до объема демо-версии, а знакомство с реальным хроматографом проходило в демонстрационном режиме. Практикум для студентов 4-го курса в рамках спецкурса "Современные методы хроматографического анализа" продолжался 20 часов, и каждый студент решал по шесть задач, часть из которых повторялась на хроматографе "Милихром A-02".

О Практикуме

* * *

Даванков В. А.

доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией стереохимии сорбционных процессов Института элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва

"Человек, сделавший свои первые шаги в химии более шестидесяти лет назад и потому явившийся свидетелем и активным участником научной революции, самым радикальным образом преобразившей саму методологию научного исследования, не перестает поражаться темпам автоматизации и компьютеризации физико-химических исследований. Как и любое другое явление, эта тенденция имеет не только положительные последствия в смысле резкого ускорения темпов получения новых научных данных, но и отрицательные стороны, например, снижение уровня понимания причинно-следственных связей и самой сущности физических явлений, происходящих в изучаемых системах и регистрируемых электронной аппаратурой. Хроматография в этом плане не является исключением. Завораживающее мигание цветных диодов и терпеливое ожидание появления очередного пика на дисплее сами по себе редко стимулируют наглядные представления о том, как мечутся молекулы аналита между возможностью продвинуться вдоль частиц сорбента в потоке подвижной фазы и возможностью хотя бы на время освободиться от части сольватационной оболочки и зацепиться за извивающиеся щупальца привитых к сорбенту алкильных цепей. А наглядные представления уже позволяли бы предвидеть влияние на конечную хроматограмму таких многочисленных факторов, как конкуренция между аналитами, скорость потока подвижной фазы, присутствие в ней органического сорастворителя, температура, размер зерна сорбента, его пористая структура, качество упаковки колонки и множество других факторов. Это предвидение называется интуицией исследователя и обычно приобретается годами практической работы.

Но наш век торопит экспериментатора, предлагая ему компьютерную имитацию эксперимента. И вот будущий летчик сидит в электронном тренажере вместо того, чтобы десятки часов летать рядом с инструктором в кабине реального самолета. Начинающему хроматографисту тоже предлагается не убивать дорогое и малодоступное оборудование в многомесячном практикуме, а познакомиться с большей частью законов хроматографии в компьютерном эксперименте. Хорошо это или плохо? Мой ответ: это веление времени, это неизбежно и уже

потому – хорошо! Важно лишь, чтобы обучающийся не механически заучивал зависимости результата хроматографии от изменения тех или иных параметров эксперимента, а за этими зависимостями представлял себе реальную картину происходящего в миниатюрной хроматографической колонке, затерянной в утробе хроматографа.

Здесь многое зависит от того, как составлено само руководство к виртуальному хроматографу. Одного из авторов данного "Практикума по ВЭЖХ" – Григория Барама – я знаю много лет как одного из самых толковых хроматографистов нашей страны. Он принимал самое активное участие в формулировании концепции микро-колоночной жидкостной хроматографии, создании реального жидкостного хроматографа, оптимизации всех его узлов от насоса и колонки до детектора и регистратора его сигнала. Он является разработчиком множества оригинальных аналитических методик и решений практических задач. Что не менее важно: Г. Барам обладает громадным опытом обучения молодежи. Если задаться вопросом, кто мог бы лучше составить краткое руководство по практической и виртуальной хроматографии, то ответ для меня был бы однозначным – у нас никто!"

* * *

Староверов С. М.

доктор химических наук, заведующий лабораторией "Новые химические технологии для медицины" Московского государственного университета

"Книга представляет собой современное методическое пособие по ВЭЖХ, представляющее интерес не только для студентов химических ВУЗов, но и для молодых специалистов. В Практикуме достаточно подробно, но при этом и лаконично изложены основные представления о хроматографическом разделении веществ в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ, доминирующего варианта современной хроматографии. Пособие хорошо организовано, наглядно, удобно и прекрасно иллюстрировано.

Особо следует отметить адекватность виртуальной разработки реальной работе химика-хроматографиста. Действительно, современный жидкостный хроматограф в реальности управляется компьютером с помощью специальных программ и основа обучения работе на приборе сводится к освоению программного обеспечения. Поэтому выбор обучающего подхода, основанного на базе приобретения первоначальных навыков в рамках

работы реальной хроматографической программы, абсолютно обоснован и, на мой взгляд, более эффективен, чем решение одной-двух практических задач группой студентов на одном приборе.

Для базовой практической подготовки специалиста в области хроматографии необходимы еще два условия – освоение методологического подхода и сохранение или воспитание "чувства вещества", позволяющего управлять процессом разделения.

Необходимо отметить, что и эти аспекты нашли свое отражение в Практикуме, как при последовательном изложении материала, так и в приведенных практических задачах. Это касается и первичных представлений о природе сорбента и вариантах механизма удерживания, выборе состава элюента, влиянии различных факторов (температура, скорость потока и т.п.) на ход эксперимента и интерпретацию результатов анализа.

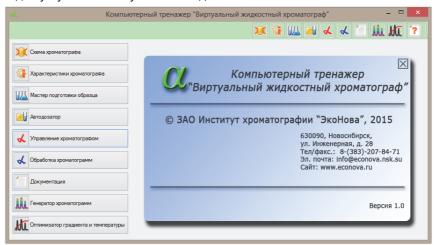
К сожалению, недостаток воспитания этих базовых принципов зачастую приводит к "специалистам", способным лишь воспроизводить опубликованные результаты с небольшими вариациями. Практикум позволяет подготовить специалиста, способного не только грамотно использовать имеющееся оборудование и программное обеспечение, но и с пониманием относиться к результатам своей работы.

Большое внимание уделяется особенностям отечественной разработки – хроматографу "Милихром А-02", в частности уникальной базе данных "ВЭЖХ-УФ", разработанной и созданной с участием авторов. Информация об отечественных достижениях в области приборостроения должна быть донесена уже на уровне студенчества.

Хотелось бы пожелать авторам продолжать начатое дело и совершенствовать реализованный подход к подготовке специалистов в области хроматографии вместе с развитием метода".

1. Главное окно Тренажера

Следуя инструкции, установите программу-тренажер на компьютер, найдите на рабочем столе иконку и щелкните по ней дважды левой кнопкой мыши. На экране появится Главное окно Тренажера. Интерфейс программы интуитивно понятен, и программа не требует специального изучения. В каждом ее окне есть свой раздел "Помощь". В разделе "Документация" (вызывается кнопкой из Главного окна Тренажера) собран большой объем справочной информации, которая полезна для углубленного изучения метода ВЭЖХ.

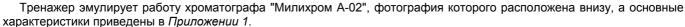


Все справочные материалы представлены в формате файлов *.pdf, для чтения которых необходима соответствующая программа (например, Adobe Acrobat Reader). Эти файлы расположены в папках ...\ChromaTrainer\Help и ...\Pdf. Их можно открывать из Проводника, не запуская Тренажер.

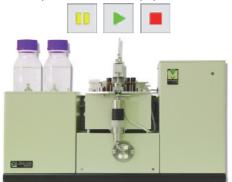
Тренажер "Виртуальный жидкостный хроматограф" работает в полном объеме только в том случае, если в *USB*-порт компьютера вставлен специальный **ключ**. Версия программы, работающая без ключа (демо-версия), имеет ряд ограничений и предназначена для первого ознакомления.

2. Окно "Схема хроматографа"

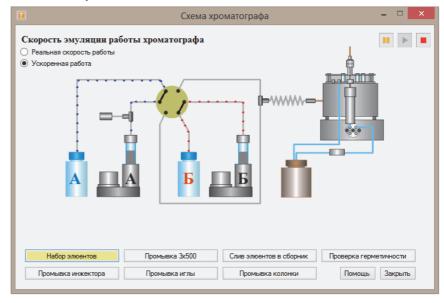
Окно открывается щелчком левой клавиши мыши по кнопке "Схема хроматографа" или по иконке



В окне "Схема хроматографа" в режиме анимации можно увидеть принципы выполнения типичных операций, названия которых написаны на соответствующих кнопках, расположенных под схемой. Каждую операцию можно приостановить, продолжить или прервать щелчком по соответствующим иконкам:



Важно! Скорость эмуляции работы хроматографа задается только в этом окне. Режим "Реальная скорость работы" (медленный режим) нужен для того, чтобы успеть рассмотреть быстрые операции ("Промывка иглы" и "Промывка инжектора"), а также для эмуляции записи УФ-спектра элюата во время хромато-



графии после остановки потока. В остальных случаях целесообразно применять режим "Ускоренная работа".

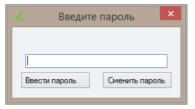
3. Окно "Характеристики хроматографа"



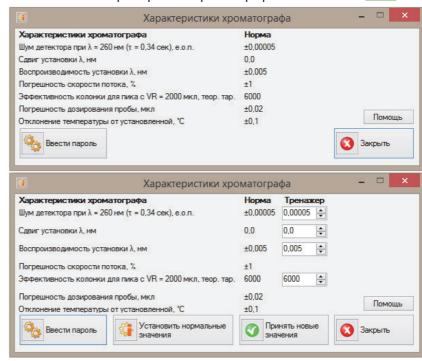
Окно открывается щелчком левой клавиши мыши по кнопке "Характеристики хроматографа" или по иконке

В таблице приведены значения основных параметров хроматографа. Пользователь, который знает пароль, может его ввести и получить возможность изменить 4 параметра в "худшую" сторону и, таким образом, "испортить" виртуальный хроматограф. Обычно владельцем пароля является Преподаватель. После ввода новых значений параметров окно приобретает свой первоначальный вид. Студент о внесенных изменениях не знает, и он обязан проверить правильность работы хроматографа экспериментально.

По умолчанию установлен пароль **есопоva**. Его можно изменить в окне, которое открывается после щелчка по кнопке "Ввести пароль":



Если Пароль утерян, то для восстановления Пароля **econova** программу надо установить заново.



Внимание! В демо-версии Тренажера изменять характеристики хроматографа нельзя.

4. Мастер подготовки образца: окно "Выбор веществ для образца"

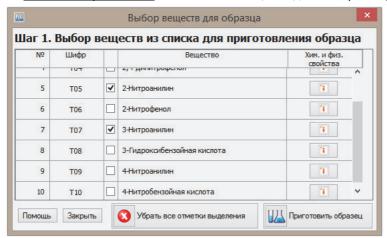
Окно открывается щелчком левой клавиши мыши по кнопке "Мастер подготовки образца" или по иконке Приготовление раствора образца производится последовательно (по "шагам"). Первый шаг – выбор веществ из списка соединений, структурные формулы которых приведены в *Приложении 2*.

Для большей наглядности мы продемонстрируем основные возможности Тренажера на примере решения задачи:

Разработать методику экспресс-определения 2-нитроанилина и 3-нитроанилина в растворе, содержащем оба эти вещества.

Начнем с приготовления раствора нитроанилинов.

Шаг 1. Выбор веществ. Отметим в таблице соединения, раствор которых мы собираемся приготовить. Щелчком ле-



вой клавиши мыши по кнопкам "і" откроем листы с информацией о свойствах этих веществ, так как нам потребуются данные об их растворимости (в воде и в этаноле) и УФ-спектры для выбора длины волны детектора. Каждому веществу соответствует специальный шифр, автоматически включаемый в название образца. Максимальное число веществ, выбираемое для приготовления раствора образца, равно 10.

Переход ко второму шагу осуществляется щелчком по кнопке "Приготовить образец".

* * *

Внимание! В полной версии Тренажера количество веществ в таблице – 30, а в демо-версии – 5.

5. Мастер подготовки образца: окно "Приготовление образца"



<u>Шаг 2. Взвешивание.</u> Теперь нам предстоит взять навески выбранных веществ. Очевидно, что раствор не должен быть слишком концентрированным, так как в этом случае высота хроматографического пика будет выходить за границу линейности детектора (8-12 е.о.п.). С другой стороны, высота пика должна быть в 10-100 раз выше уровня шумов детектора, который составляет 0,0001-0,001 е.о.п., в зависимости от установленной длины волны и времени измерения. Оценку требуемой концентрации раствора можно сделать по уравнению, приведенному в *Приложении 10*, или выбрать ее опытным путем методом "проб и ошибок", что потребует существенно больших затрат времени. Воспользуемся примером расчета концентрации раст

вора для 2-нитроанилина из *Приложения 10* и приготовим раствор с концентрацией веществ по 0,1 мг/мл. Установим навески по 10 мг и щелкнем курсором по кнопке "Взять навески". Отметим, что навески взяты с погрешностью ±0,1 мг.



<u>Шаг 3. Выбор растворителя.</u> В качестве растворителя для нитроанилинов можно выбрать и воду, и этанол, но вода предпочтительнее, так как на практике при вводе в колонку с обращенно-фазовым адсорбентом водного раствора симметрия пиков будет заметно лучше, потому что вода как элюент слабее этанола.



<u>Шаг 4. Растворение смеси веществ.</u> Здесь нам потребуется выбрать мерную колбу, в которую мы поместим взятые навески и которую заполним до метки выбранным растворителем. Так как мы готовим раст-

Ошибка

Не все вещества растворились, образец

испорчен, придется начинать сначала.

OK

вор с концентрацией веществ по 0,1 мг/мл, то объем колбы должен составить 100 мл. Выбрав колбу, щелкнем по кнопке "Растворить навески".

Если одно из веществ в выбранном растворителе не растворяется, то после щелчка по кнопке "Растворить навески" появится сообщение об ошибке и процедуру приготовления образца, начиная с Шага 1, придется повторить.

Погрешность концентрации полученного раствора будет определяться "чис-

тотой" вещества (по умолчанию чистота всех веществ в Таблице составляет 100%), погрешностью весов, которая составляет \pm 0,1 мг, погрешностями мерных колб, которые, согласно ГОСТ 1770-74, равны значениям, приведенным в таблице:

Объем колбы, мл	25	50	100	250	500	1000
Допустимая погрешность, мл	±0,08	±0,12	±0,2	±0,3	±0,5	±0,8

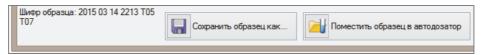


<u>Шаг 5. Фильтрование.</u> На этом этапе раствор образца должен быть профильтрован через фильтр с порами 0,2-0,45 мкм. В ВЭЖХ это правило нарушать нельзя. В противном случае входной фильтр колонки быстро засорит-

ся и его придется менять, а это может сделать только опытный специалист.

Процедура фильтрования в Тренажере не эмулируется, а сводится к вызову на экран Инструкции, в которой приведены типы фильтров и их совместимость с различными растворителями. Щелчок по кнопке "Инструкция" активирует кнопку "Фильтровать раствор". Щелкнув по ней, мы закончим приготовление раствора образца.

После выполнения команды "Фильтровать раствор" в нижней части окна появится следующая информация:



Шифр приготовленного образца генерируется автоматически. В него включены *вод* (2015), *месяц* (03), *число* (14), *часы* и *минуты* (2213) и *шифры* соединений из "Списка веществ" (*T05* и *T07*). Состав образца можно сохранить в файлах *.sample и/или *.xml, изменив название-шифр, например, на "Нитроанилины". По умолчанию файлы сохраняются в папку ...\ChromaTrainer\Samples\. После сохранения файла с новым именем, это имя появится в строке "Шифр образца:". Файлы *.sample предназначены для загрузки образцов в Автодозатор, а файлы *.xml – для загрузки в программу "Оптимизатор градиента и температуры".

Теперь нам остается выполнить команду "Поместить образец в автодозатор" и перейти в следующее окно.

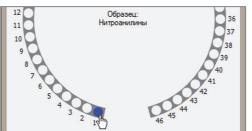
Внимание! Состав образца узнать из файла нельзя, поэтому всю процедуру его приготовления необходимо записать в лабораторный журнал. В демо-версии Тренажера состав образца можно сохранять только в файл *.xml.

6. Окно "Автодозатор"

Окно открывается щелчком по кнопке "Автодозатор", по иконке " или по кнопке "Поместить образец в автодозатор" в окне "Приготовление образца". В последнем случае в верхней части окна будет указан шифр образца.

Автодозатор Шифр (имя) образца: Нитроанилины 12 Загрузить образец из Закрыть Помощь

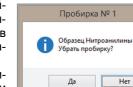
Установим пробирку с приготовленным образцом "Нитроанилины" в гнездо "1", для чего наведем курсор на это гнездо и щелкнем любой



клавишей мыши. Гнездо зальется синим цветом и в центре кассеты появится надпись:

Образец: Нитроанилины

Если на это гнездо навести курсор и щелкнуть по нему клавишей мыши, то появится сообщение:



По команде "Загрузить образец из файла" можно загружать заранее приготовленные образцы, состав которых записан в файлах *.sample, хранящихся по умолчанию в папке ...\ChromaTrainer\ Samples.

Чтобы узнать название образца в "синем" гнезде, надо навести на него курсор и прочитать шифр образца в центре кассеты.

Установив пробирку с раствором образца "Нитроанилины", перейдем к выполнению хроматографического анализа, щелкнув по кнопке "Перейти к анализу".

Внимание! В демо-версии Тренажера загрузка образцов в кассету автодозатора из файлов не предусмотрена.

7. АльфаХром-Т: окно "Настройки хроматографа"

Виртуальный хроматограф управляется программой "АльфаХром-Т". Запустим её щелчком по иконке или по кнопкам "Управление хроматографом" или "Перейти к анализу" и откроем окно "Настройка/Настройки хроматографа". Неактивные поля в Тренажере не редактируются. Их назначение можно узнать из Руководства по эксплуатации хроматографа "Милихром A-02".

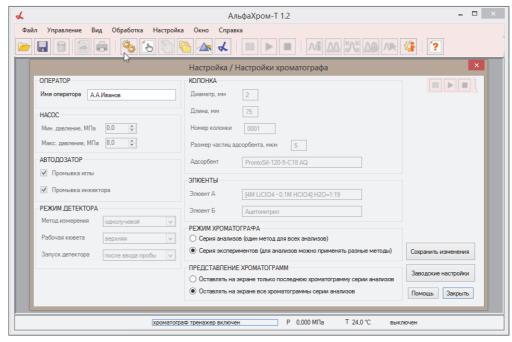
Отметим, что в Тренажере не предусмотрен выбор колонок и элюентов. Все эксперименты осуществляются на колонке Ø2 x 75 мм с обращенной фазой "C18" Pronto-S/L-120-5-C18 AQ и с элюентами **A** и **Б**:

- 0,2 M LiClO₄ 5 MM HClO₄;
- ацетонитрил.

Установим режимы, как показано на рисунке. Режим "Серия анализов" применяется в тех случаях, когда все образцы в серии анализов хроматографируются одним методом и хроматограммы обрабатываются тоже одним методом.

В поле "Имя оператора" вписывается фамилия, которая будет включаться во все последующие отчеты.

Сохраним изменения и закроем окно.



8. АльфаХром-Т: окно "Ручные операции"

(P)

Откроем окно "Ручные операции" командой "Управление/Ручные операции" или щелчком по иконке

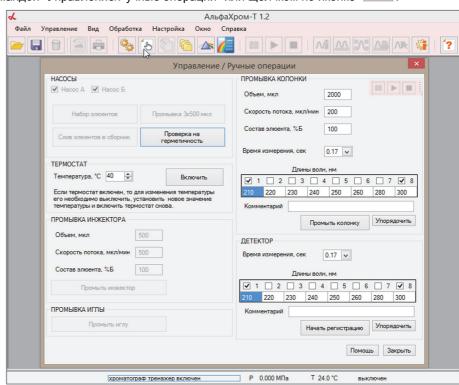
В этом окне можно осуществить следующие действия:

- проверить герметичность системы;
- установить температуру термостата колонки и включить его;
- промыть колонку элюентом заданного состава с заданной скоростью потока и определить величину давления на ее входе;
- измерить уровень шумов детектора при заданных длинах волн и разных значениях времени измерения.

Остальные операции в Тренажере не эмулируются. Игла инжектора, сам инжектор и колонка всегда "чистые".

Установив значение температуры термостата 40°С, включим его. Закроем окно после того, как в статусной строке в нижней части окна появится информация:





9. АльфаХром-Т: окно "Эксперимент"

Откроем окно "Эксперимент" командой "Управление/Эксперимент" или щелчком по иконке

ловия серии экспериментов, которые мы проведем для решения нашей Задачи.

Пусть температура термостата будет 40°C.

Пробирка с образцом уже установлена в гнездо Автодозатора № 1. Введем объем инжектируемой пробы 2 мкл и в поле "Описание образца" кратко запишем его состав.

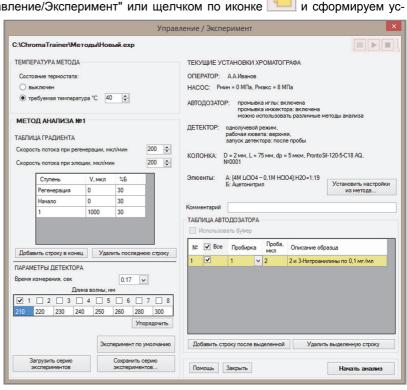
Установим скорости потока при регенерации и при элюции по 200 мкл/мин. Так как в Тренажере колонка всегда "чистая", то регенерировать её не требуется, и объем элюента для регенерации выбираем "0 мкл"¹⁾.

Мы не знаем, как нитроанилины хроматографируются на колонке, поэтому сделаем три эксперимента, в которых содержание ацетонитрила в элюенте (%Б) будет 30, 40 и 50%. Объем элюента для хроматографии в ТАБЛИЦЕ ГРАДИЕНТА (Ступень 1) выберем 1000 мкл. Для Метода анализа № 1 установим в ТАБЛИЦЕ ГРАДИЕНТА для ступеней "Регенерация", "Начало" и "1" концентрацию Б 30%.

Установим параметры детектора: время измерения "0,17 с"; длина волны "210 нм".

Метод анализа № 1 создан.

¹⁾ В "реальном" эксперименте для регенерации колонки достаточно 600 мкл элюента.



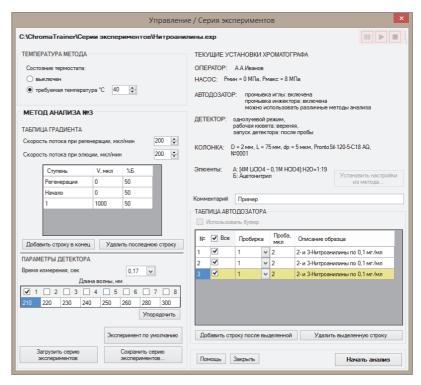
Теперь добавим строку в Таблицу автодозатора и для **Метода анализа № 2** в Таблице градиента изменим состав элюента с 30 на 40% **Б**. Добавим в Таблицу автодозатора ещё одну строку и для **Метода анализа № 3** заменим содержание ацетонитрила в элюенте с 40 на 50%.

Мы задали Серию экспериментов, теперь запишем ее в файл, щелкнув по кнопке "Сохранить серию экспериментов". Назовем ее "Нитроанилины.exp".

Прежде, чем начать анализ, поясним, почему выбрали такие условия.

- 1. Мертвый объем колонки равен 150 мкл, поэтому объем элюента 1000 мкл позволит наблюдать пики веществ, имеющие k = 5-6 (см. Приложение 4).
- 2. Время измерения детектора 0,17 с позволит при одноволновой детекции и при скорости потока 200 мкл/мин для пика "шириной" 20 мкл получать более 25 значений оптической плотности. Уменьшение времени измерения в 4 раза даст в 4 раза более детальную картину, но шумы детектора станут в 2 раза выше.
- 3. Длину волны 210 нм мы выбрали потому, что растворы всех веществ, включенных в Тренажер, в этой области спектра имеют высокий коэффициент экстинкции.

Для выполнения серии экспериментов щелкнем по кнопке "Начать анализ".



10. АльфаХром-Т: трансформирование хроматограммы на экране

Результатом проведенной серии анализов будут три хроматограммы, которые последовательно появятся на экране монитора. Для того, чтобы сравнить их друг с другом, поясним, как можно трансформировать хроматограмму с помощью команд из меню "Вид", "Настройка", "Окно". Многие из них продублированы иконками и содержатся в выпадающем меню активного окна, которое вызывается нажатием на

ке, расположенной над хроматограммой.

левую клавишу мыши, когда курсор находится внутри окна.

Выбор кривых для отображения на графике осуществляется в стро-

Из выпадающего меню активного окна можно выполнить следующие команды:

Показать весь график (без зашкаливания)
Показать информацию (об анализе)
Настроить график (объем/еремя, цена деления)
Изменить все окна по активному (масштаб, линии)
Закрыть окно

Первые три команды продублированы соответствующими иконками:



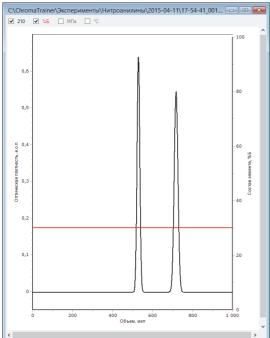




Масштаб графика можно увеличить зуммированием. Для этого курсор устанавливают в левый верхний угол воображаемой выделяемой прямоугольной области, нажимают левую клавишу мыши и, удерживая ее, сдвигают курсор в нижний правый угол. Выделив часть графика, кнопку надо отпустить. Зуммирование из нижних и верхнего правого углов сбрасывает масштаб графика до "показать все".

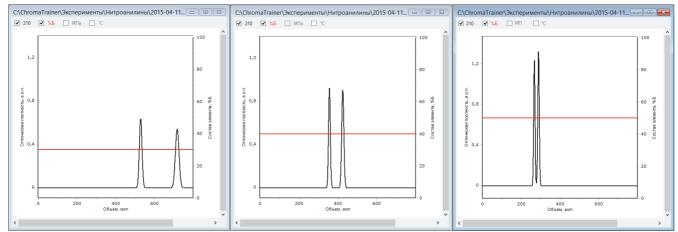
Когда открыто несколько окон, их можно сгруппировать на экране вертикально или горизонтально командами из меню "Окно".

Все начальные графические настройки можно изменить по своему усмотрению и сохранить в меню "Настройка/Начальные настройки графиков...".



11. АльфаХром-Т: сравнение хроматограмм

На рисунке показаны хроматограммы, файлы которых (*.chrx) автоматически записаны в папку ...\Эксперименты\Нитроанилины\гггг-мм-дд. Каждому файлу присвоено имя по времени его создания: чч-мм-сс_ххх (ххх – номер в серии). Сравнение хроматограмм показывает, что лучший результат получен в эксперименте № 2, где элюент содержал 40% **Б**. В первом опыте мы видим "излишне хорошее" разделение пиков, а в третьем – пики разделились, но, по нашему мнению, "недостаточно хорошо".

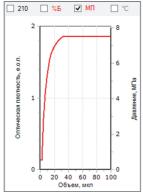


Время анализа во втором эксперименте составляет 2,5 мин. Можно ли его уменьшить? Ведь условие Задачи: "Разработать методику экспресс-анализа".

Очевидно, что для ускорения анализа надо повысить скорость потока элюента. Максимально возможную скорость потока легко определить "экспериментально", промывая колонку в окне "Ручные операции" элюентом, содержащим 40% **Б.** Будем последовательно повышать скорость потока до тех пор, пока не достигнем предельно допустимого давления, которое для хроматографа составляет 8 МПа. Чтобы снизить вязкость подвижной фазы установим температуру термостата на 80°C, что на 1,6°C ниже температуры кипения ацетонитрила (см. *Приложение* 8).

12. Ускорение анализа

Промоем колонку элюентом, содержащим 40% **Б**, со скоростями потока 400, 600, и 800 мкл/мин. Из трех полученных графиков следует, что давление близкое к предельно допустимому достигается при скорости 800 мкл/мин, которая и будет максимально допустимой. Теперь остается выполнить разделение нитроанилинов в



новых условиях. Если разрешение пиков останется приемлемым, то поставленная задача будет решена, если оно снизится и мы захотим его улучшить, сделать это можно будет путем корректировки состава подвижной фазы, уменьшив концентрацию ацетонитрила на несколько процентов.

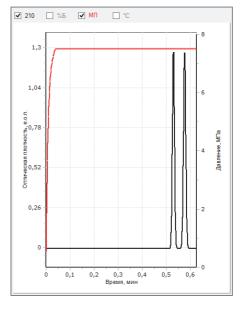
Из хроматограммы следует, что время анализа максимально сокращено — оно составило примерно $40\ c$ — и вещества разделились достаточно хорошо¹⁾.

Однако назвать решением Задачи это ещё нельзя, так как пики на хроматограмме не идентифицированы, и не получены градуировочные (калибровочные) коэффициенты, необходимые для вы-

полнения количественного определения нитроанилинов (см. Приложение 6).

Далее покажем, как это можно сделать четырьмя способами:

- по объемам удерживания веществ, найденным из хроматограмм индивидуальных соединений;
- методом "добавки";
- по спектральным характеристикам (спектральным отношениям) веществ;
- по Базе данных "ВЭЖХ-УФ".



¹⁾ Мы увеличили скорость потока по сравнению с первоначальной в 4 раза, но не уменьшили время измерения детектора (τ). Несмотря на то, что пики веществ по времени стали более "узкими", τ = 0,17 с оказывается вполне достаточным.

13. Идентификация пиков веществ методом внешнего стандарта

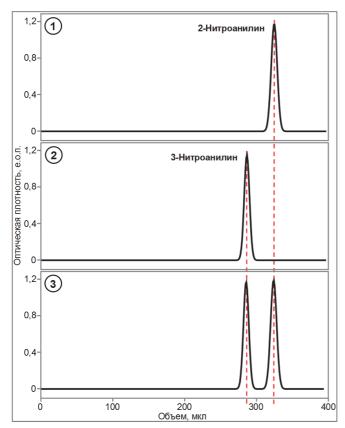
Калибровка хроматографа по растворам стандартных образцов является необходимой процедурой, с которой начинается разработка методики любого хроматографического анализа (см. *Приложение* 6). Она заключается в хроматографировании проб растворов индивидуальных веществ-аналитов с известной концентрацией с двумя целями:

- определение объемов удерживания (V_R) целевых веществ, по значениям которых будет проводиться идентификация их пиков на хроматограмме (качественный анализ);
- нахождение площадей пиков (S) веществ-аналитов, необходимых для вычисления калибровочных коэффициентов, с помощью которых будет осуществляться определение их концентрации в анализируемых растворах (количественный анализ).

Возвращаясь к нашей Задаче, приготовим растворы "внешних стандартов" – водные растворы 2- и 3-нитроанилина с концентрацией по 0,1 мг/мл – и раствор смеси нитроанилинов с концентрацией по 0,1 мг/мл. Поместим пробирки с растворами в кассету автодозатора, выберем режим работы хроматографа "Серия анализов", установим температуру термостата колонки 80°С и включим его. В окне "Серия анализов" зададим условия экспресс-анализа:

требуемая температура: 80°C			
скорость потока: 800 мкл/мин			
ступень "регенерация": 0 мкл, 40% Б			
ступень "начало": 0 мкл, 40% Б			
ступень "1": 400 мкл, 40% Б			
время измерения: 0,17 с			
длина волны: 210 нм			
пробирка 1: 2 мкл – 2-нитроанилин в воде (0,1 мг/мл)			
пробирка 2: 2 мкл – 3-нитроанилин в воде (0,1 мг/мл)			
пробирка 3: 2 мкл – 2- и 3-нитроанилины в воде (по 0,1 мг/мл)			

Сохраним метод и серию анализов в файле <Нитроанилины_800.mtd> и проведем серию анализов, расположим полученные хроматограммы "По горизонтали" и приведем их к одному масштабу, как показано на рисунке.

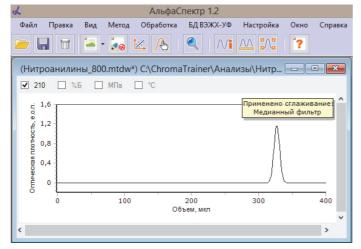


Поскольку мы знаем, что на хроматограмме "1" пик соответствует 2-нитроанилину, а на хроматограмме "2" - 3-нитроанилину, то, сопоставляя объемы удерживания (красные пунктирные линии), делаем вывод: на хроматограмме "3" первый пик принадлежит 3-нитроанилину, а второй – 2-нитроанилину. Такой способ идентификации путем визуального сравнения хроматограмм можно применять лишь в простых случаях, когда пиков на хроматограмме мало и они хорошо разделены. Однако, даже в нашем примере мы видим, что объемы удерживания пиков на нижней хроматограмме несколько отличаются от объемов удерживания пиков на хроматограммах "1" и "2" (см. таблицы на стр. 29). Эти различия обусловлены неизбежными погрешностями, характерными для хроматографов, и виртуальный хроматограф их "честно" эмулирует. Величины погрешностей находят путем статистической обработки результатов серии экспериментов (в простейшем случае, например, как $V_{Rmax} - V_{Rmin}$).

В современных хроматографах удерживание измеряют не линейкой на хроматограмме, записанной на ленте регистрирующего самописца, а вычисляют с помощью компьютерных программ. Такой программой, названной "АльфаСпектр", снабжен и наш хроматограф.

Чтобы провести математическую обработку хроматограммы её можно загрузить в программу АльфаСпектр непосредственно из программы АльфаХром-Т. Для этого активируем окно с хроматограммой, предназначенной для обработки, и выполним команду "Обработка/Обработать в АльфаСпектр" или щелкнем по соответствующей иконке:



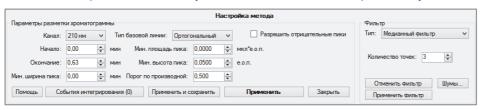


Загрузим в программу АльфаСпектр хроматограмму 2-нитроанилина и проведем её обработку.

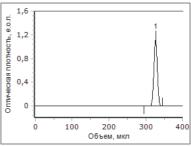
На рисунке показана хроматограмма 2-нитроанилина в окне программы АльфаСпектр. Её файл по умолчанию автоматически записывается в папку (<...\Chroma-Trainer\Aнализы\Hитроанилины_800\2015-04-01\>) и получает прежнее имя (09-11-03_001), но с расширением *.chrw. Сообщение в рамке в верхнем правом углу информирует о том, что по умолчанию хроматограмма "сглажена" с применением медианного фильтра. Метод обработки хроматограммы по умолчанию получает такое же имя, как и метод анализа (Нитроанилины_800), но с расширением *.mtdw. Его файл записывается в папку <...\ChromaTrainer\Mетоды>.

Параметры обработки хроматограммы установлены по умолчанию. В каждом методе обработки они должны быть скорректированы, исходя из целей анализа. Корректировка осуществляется в панели "Метод/Настройка

метода...". Откроем ее, оставим "установки" без изменения, "Применим" установки и закроем панель.



Таким образом, мы осуществили "обнаружение" пика, который получил номер "1". Начало и конец пика отмечены вертикальными отрезками у его основания, соединенными "базовой линией". Метки пика и базовую линию можно сделать невидимыми, изменив установки в окне "Настройки/Настройка графика".



Теперь мы можем узнать (вычислить) объем удерживания 2-нитроанилина. Для этого откроем окно "Настройка отчета" командой "Метод/Стандартный отчет", отметим пункт "Удерживание (Vr)" в поле "Столбцы:" и щелкнем по полю "Просмотр отчета". В нижней части открывшегося окна "Отчет" расположена "Таблица пиков", в которой всего одна строка, в которой указан объем удерживания пика № 1 — 328 мкл.

Настройка отчета - 09-11-03 001.chrw Разделы отчета Внутренний стандарт ✓ Общая информация Использовать внутренний стандарт ✓ Проба Концентрация: 1.000 ✓ Колонка Мертвый объем колонки: 150 ✓ Элюенты Столбцы ✓ График Удерживание (Vr Высота пика (h) ▼ Таблица градиента Ширина пика при h/2 (w) ▼ Таблица пиков Площадь пика (S) Канал интегрирования (\) Только компоненты Площадь пика (\$%) Фактор удерживания (к) Комментарий Разрешение пиков n и n+1 (Rs) Эффективность колонки (N) Параметры детектора Эффективность колонки (N/метр) Параметры разметки вэтт B3TT/dp Таблица компонентов Асимметрия пика (А) Концентрация (С) Спектральные отношения Концентрация (С %) Относительная концентрация (Сот) Результаты градуировки Относительная концентрация (Сот %) Имя компонента Размер графика: 75 🖨 мм Выбор формул.. Сохранить отчет в файл. Печать отчета Просмотр отчета Сохранить настройки в метод Помощь Закрыть

Чтобы идентифицировать пики на хроматограмме смеси нитроанилинов нам предстоит определить объемы удерживания на двух оставшихся хроматограммах. Прежде, чем их обрабатывать, сохраним настройки метода Нитроанилины 800.mtdw щелчком по полю

"Сохранить настройки в метод" в окне "Настройка отчета".

Хроматограмма	№ пика	V_R , м кл	
2-Нитроанилин	1	328	
3-Нитроанилин	1	291	
2- и 3-Нитроанилины	1	291	
2- и 5-питроанилины	2	330	

Результаты обработки хроматограмм приведены в таблице. Сравнивая значения V_R , мы можем предположить, что на хроматограмме "2- и 3-Нитроанилины" пик № 1 принадлежит 3-нитроанилину, а пик

№ 2 — 2-нитроанилину. Чтобы ответ из "предположительного" стал "обоснованным", нам необходимо привести величины V_R с указанием доверительных интервалов. Их значение можно взять из Технических условий на хроматограф "Милихром А-02" или определить из серии экспериментов. Воспользуемся данными из ТУ, где говорится, что погрешность определения объемов удерживания в изократическом режиме не превышает 1%, и уточним результаты в таблице:

Хроматограмма	№ пика	V_R , мкл	Интервал V_R , мкл
2-Нитроанилин	1	328 ± 1,5	326,5 ÷ 329,5
3-Нитроанилин	1	291 ± 1,5	289,5 ÷ 292,5
2- и 3-Нитроанилины	1	291 ± 1,5	289,5 ÷ 292,5
	2	330 ± 1,5	328,5 ÷ 331,5

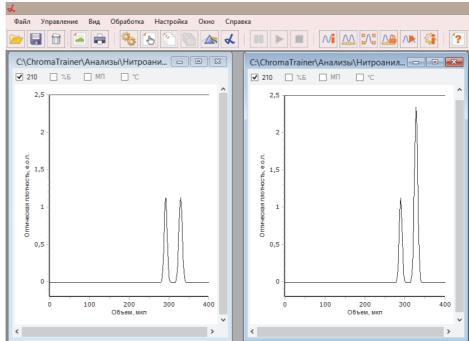
Теперь правильность идентификации метрологически обоснована.

14. Идентификация пиков веществ методом добавки

Второй общепризнанный способ идентификации пиков веществ на хроматограмме заключается в добавлении в исследуемый раствор одного из веществ, чтобы заметно повысить его концентрацию. Это приведет к тому, что на хроматограмме высота пика вещества (и его площадь) пропорционально увеличатся, что позволит вещество идентифицировать однозначно.

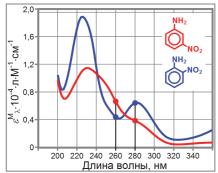
Чтобы применить этот подход для решения нашей Задачи, добавим к раствору 2- и 3-нитроанилинов, содержащему по 0,1 мг/мл каждого вещества, 2-нитроанилин, чтобы его концентрация увеличилась в 2 раза, и сравним хроматограммы исходного и нового растворов. Вывод очевиден – второй пик на хроматограммах принадлежит 2-нитроанилину.

В отличие от предыдущего способа идентификации метрологические характеристики хроматографа на надежность ответа здесь не влияют. "Метод добавки" целесообразно использовать в тех случаях, когда разделение пиков на хроматограмме неполное и погрешность определения удерживания не дает возможности сделать выбор между двумя соседями.



15. Идентификация пиков веществ по спектральным отношениям

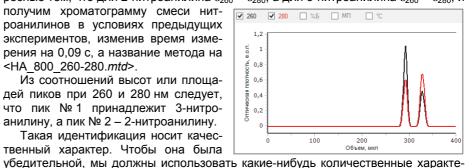
Второй способ идентификации пиков веществ на хроматограмме основан на применении многоканального детектирования, о котором рассказано в Приложении 11. Этот способ можно использовать в тех случаях, когда УФ-спектры веществ заметно отличаются друг от друга, как, например, в случае нитроанилинов. Их спектры, взятые из "Информации о веществах" в "Мастере подготовки образца", представлены на рисунке. Выберем длины волн 260 и 280 нм, инте-



ресные тем, что для 2-нитроанилина $\varepsilon_{260} < \varepsilon_{280}$, а для 3-нитроанилина $\varepsilon_{260} > \varepsilon_{280}$, и получим хроматограмму смеси нитроанилинов в условиях предыдущих экспериментов, изменив время измерения на 0,09 с, а название метода на <HA 800 260-280.mtd>.

Из соотношений высот или площадей пиков при 260 и 280 нм следует, что пик № 1 принадлежит 3-нитроанилину, а пик № 2 – 2-нитроанилину.

Такая идентификация носит качественный характер. Чтобы она была



ристики, например "спектральные отношения". В первом приближении их можно вычислить из спектров как отношение экстинкций $\varepsilon_{280}/\varepsilon_{260}$ или $\varepsilon_{260}/\varepsilon_{260}$, но более точно спектральные отношения определяются хроматографически.

С этой целью запишем хроматограммы растворов 2- и 3-нитроанилинов, загрузим одну из них в программу Альфа-Спектр и настроим метод обработки. Чтобы найти спектральные отношения $R = S_{280}/S_{260}$, которые численно равны отношениям $\varepsilon_{280}/\varepsilon_{260}$, в разделе меню "Метод/Выбрать опорный канал..." выберем канал "260 нм", в окне "Стандартный

отчет/Настройка отчета" отметим опции "Спектральные отношения" и "Удерживание (Vr)", "Сохраним настройки в метод", щелкнем по панели "Просмотр отчета" и выпишем значения V_R и S_{280}/S_{260} в таблицу. Далее загрузим в программу АльфаСпектр оставшиеся хроматограммы и найдем значения V_R и S_{280}/S_{260} пиков. Сопоставление величин S_{280}/S_{260} подтверждает полученный ранее "качественный" вывод.

Хроматограмма	№ пика	V_R , мкл	S ₂₈₀ /S ₂₆₀	
2-Нитроанилин	1	328	1,51	
3-Нитроанилин	1	289	0,60	
2- и 3-Нитроанилины	1	292	0,60	
2- и 3-питроанилины	2	330	1,51	

16. Идентификация пиков веществ по Базе данных "ВЭЖХ-УФ"

Отличительной особенностью реального и виртуального хроматографов "Милихром A-02" от других жидкостных хроматографов является то, что они снабжены Базой данных для 500 веществ, в которой хранятся калибровочные параметры, позволяющие идентифицировать пики этих веществ на хроматограмме по спектральным отношениям S_{220}/S_{210} ,

 $S_{230}/S_{210},\ S_{240}/S_{210},\ S_{250}/S_{210},\ S_{260}/S_{210},\ S_{280}/S_{210}$ и S_{300}/S_{210} , а также определять их концентрацию в растворе образца.

Перед анализом с идентификацией веществ по Базе данных, детектор необходимо "валидировать", т.е. проверить правильность его настройки (см. $3a\partial$ aчу 4). Для идентификации нитроанилинов проведем их экспресс-разделение, установив в детекторе длины волн 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм и τ = 0,03 с. Метод анализа запишем в файл <HA_800_БД.mtd>. Полученная 8-волновая хроматограмма приведена на верхнем рисунке.

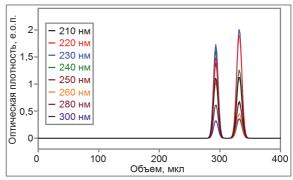
Загрузим эту хроматограмму в программу АльфаСпектр и сформируем метод обработки < HA_800_БД.mtdw >:

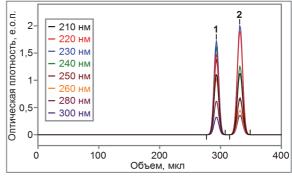
- в окне "Метод/Настройка метода" установим канал разметки пиков "210 нм", минимальную высоту пика 0,05 е.о.п., порог по производной 0,05 и применим медианный фильтр "3 точки";
- в окне "Метод/Выбрать опорный канал" установим "210 нм";
- выполним команду "Метод/Сохранить метод".

Размеченная хроматограмма показана на нижнем рисунке. Далее откроем окно "Мастер распознавания" командой "БД ВЭЖХ-УФ/Мастер распознавания" или с клавиатуры (Ctrl+R), или щелчком по иконке:



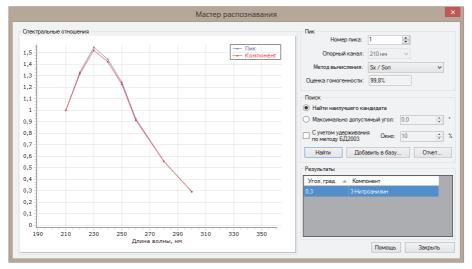
В левой части окна "Мастер распознавания" помещен спектр выбранного пика, нормированный к оптической плотности при





 λ = 210 нм (опорный канал), а в правой — параметры распознавания, суть которых объясняется в *Приложении 11*. Опцию "С учетом удерживания по методу БД2003" надо отключить, так как у нас метод другой. Результат идентификации появляется в таблице после щелчка по кнопке "Найти". Одновременно с результатом на экран для визуального сравнения выводится спектр **Компонента** из Базы данных.

На рисунке приведен пример распознавания пика № 1, который идентифицирован как "3-Нитроанилин". Переключившись на пик № 2 и щелкнув по кнопке "Найти", убеждаемся, что ему соответствует "2-Нитроанилин".



Важно отметить, что идентификация пиков с использованием спектральной информации дает хорошие результаты только в том случае, если состав растворителя, в котором был записан "эталонный" спектр, близок к составу элюента.

* * *

Итак, мы идентифицировали пики нитроанилинов на хроматограммах четырьмя способами. Для решения Задачи нам остается "научить" программу АльфаСпектр определять концентрацию веществ в растворах образцов.

17. Определение концентрации веществ в анализируемых растворах

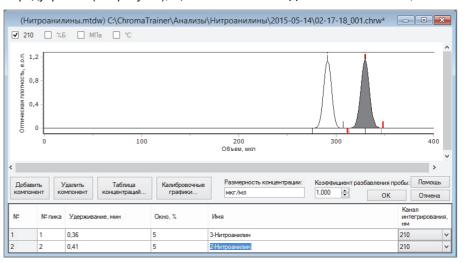
Для определения концентрации веществ в анализируемых растворах хроматограф необходимо предварительно откалибровать по растворам этих веществ, в которых концентрация нам известна, т.е по "стандартным" растворам. Сделаем это следующим образом:

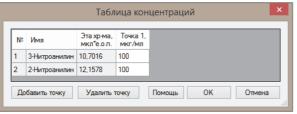
- приготовим два раствора смеси 2- и 3-нитроанилинов в воде с концентрациями по 0,1 и 0,4 мг/мл каждого вещества;
- установим в хроматографе режим "Серия анализов" и температуру термостата 80°С;
- загрузим метод анализа <Нитроанилины 800.mtd>и получим хроматограммы двух стандартных растворов;
- загрузим хроматограмму раствора с концентрациями по 0,1 мг/мл в программу АльфаСпектр;
- разметим пики нитроанилинов на хроматограмме, как делали это ранее, и проведем градуировку (калибровку).

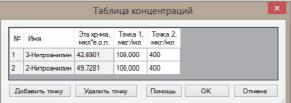
Откроем панель "Метод/Компоненты и градуировка" (см. рисунок), щелкнем по кнопке "Добавить компонент", в поле

"№ пика" введем "1" и дадим ему имя "3-Нитроанилин". Таким же образом добавим второй компонент и дадим ему имя "2-Нитроанилин". При редактировании строки компонента в таблице его пик на хроматограмме заливается серым цветом, а метки пика становятся красными.

Далее надо ввести концентрации компонентов. Выберем размерность "мкг/мл", откроем "Таблицу концентраций", "Добавим точку" (градуировочную), введем значения концентраций компонентов, как показано на рисунке, щелкнем по кнопке "ОК", закроем панель "Компоненты и градуировка" щелчком по кнопке "ОК" и сохраним метод командой "Метод/Сохранить метод".



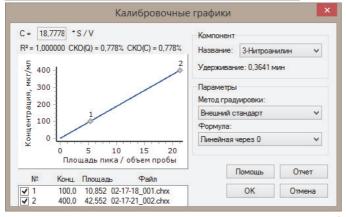




Повторим процедуру градуировки, используя вторую хроматограмму с концентрацией нитроанилинов по 0,4 мг/мл, для чего загрузим ее в программу АльфаСпектр, откроем панель "Компоненты и градуировка" и "Таблицу концентраций", "Добавим точку" (градуировочная точка 2), введем концентрации компонентов (см. рисунок), щелкнем по кнопке "ОК", закроем панель "Компоненты и градуировка" щелчком по кнопке "ОК" и сохраним метод командой "Метод/Сохранить метод".

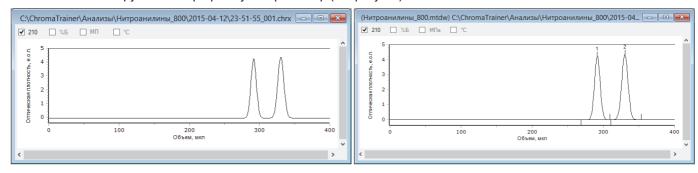
Градуировочные графики для нитроанилинов показаны на нижних рисунках. Они открываются из панели "Компоненты и градуировка". Над графиками приведены значения коэффициента корреляции R^2 и среднеквадратичное отклонение (СКО) по количеству (Q) и концентрации (C) вещества.

Теперь нам осталось лишь продемонстрировать, как пользоваться разработанным методом и получать полноценный отчет о результатах анализа. Для этого приготовим водный раствор





нитроанилинов с концентрациями по 0,25 мг/мл, получим хроматограмму по методу Нитроанилины_800.*mtd* для пробы объемом 3 мкл и загрузим её в программу АльфаСпектр (см. рисунок).



Справа показан фрагмент отчета с результатами анализа. Найденные концентрации нитроанилинов отличаются от заявленных примерно на 0,5%. Эта погрешность обусловлена и погрешностью приготовления раствора, и погрешностью хроматографической процедуры. Для рутинного хроматографического анализа её величину можно считать характерной, но если требуется более высокая точность анализа, химик-аналитик должен потрудиться дополнительно.

Vr - объем удерживания S - площадь пика С - концентрация S, мкл*е.о.п. С, мкг/мл Nº Vr, мкл Имя 291 40.2359 251.3 3-Нитроанилин 331 251.9 46.9130 2-Нитроанилин

Таблица пиков (канал разметки: 210 нм):

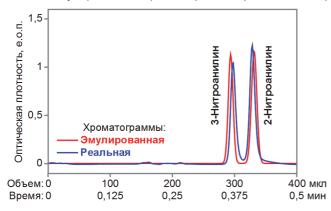
Условные обозначения:

Количественный анализ на виртуальном хроматографе

можно проводить с использованием Базы данных "ВЭЖХ-УФ", в которой имеются калибровочные коэффициенты для 500 веществ, в том числе и для веществ, включенных в Тренажер. Применение Базы данных возможно в тех случаях, когда разделение выполняется по методу <DB_2003.mtd>. Возможности этого метода анализа проиллюстрированы на примере решения Задачи 5.

18. Сравнение реальной и виртуальной жидкостной хроматографии

До сих пор мы не задавали вопрос: "Насколько корректно эмулируются хроматограммы, и насколько точно виртуальный хроматограф соответствует реальному?". Ответить на него однозначно не так-то просто. Математические модели хроматографического процесса и работы всех узлов хроматографа имеют свои погрешности, определяющие точность эмулирования, и в каждом конкретном случае ответ будет свой. Тем не менее, мы можем утверждать, что наибольшее отличие эмулированных хроматограмм от реальных не превышает 10%, а в своем большинстве составляет 1-2%.



Покажем это на примере разработанной нами экспрессметодики определения 2- и 3-нитроанилинов. Эмулированная и реальная хроматограммы приведены на рисунке, а результаты обработки хроматограмм – в таблице.

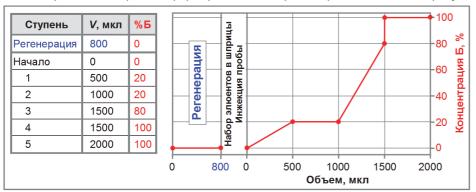
Наибольшие различия видны для высоты и площади пика 2-нитроанилина. Мы объясняем их погрешностью приготовления реального раствора, в котором концентрация 2-нитроанилина оказалась несколько выше. Различия в значениях максимального давления могут быть связаны с меньшей плотностью упаковки реальной колонки.

В целом, виртуальный хроматограф вполне адекватно эмулирует работу реального, что позволяет использовать его не только для начального Практикума, но и для более глубокого изучения метода ВЭЖХ.

Хроматограмма	Вещество	V _R , мкл	h , е.о.п.	S , мкл*е.о.п.	N , теор. тар.	Разрешение пиков (R s)	Р _{макс} , МПа
Эмулированная	3-Нитроанилин	294	1,124	10,672	5980	2.31	7,5
Омулированная	2-Нитроанилин	331	1,155	12,451	5916	2,51	7,5
Реальная	3-Нитроанилин	298	1,052	10,992	5730	1,92	6.8
геальная	2-Нитроанилин	328	1,234	14,672	6422	1,92	0,8

19. Градиентное элюирование

Когда в анализируемом растворе веществ больше двух, для ускорения анализа, как правило, целесообразно применять не изократическое, а градиентное элюирование, которое позволяет сблизить пики на хроматограмме в соответствии с желаемым разрешением $R_{n,n+1}$. При градиентном элюировании концентрация *сильного* компонента подвижной фазы изменяется согласно задаваемой функции. Практически во всех хроматографах эта функция является кусочнолинейной. В Тренажере, как и в хроматографе "Милихром А-02", она может иметь до 20 отрезков (ступеней). Бинарный градиент сильного компонента создается с помощью двух шприцевых насосов – насос "А" со слабым элюентом **A**, насос "Б" с сильным элюентом **Б**. В соответствии с заданной функцией изменяется скорость подачи (F) каждого насоса при условии, что скорость подачи подвижной фазы в колонку постоянна: $F = F_A + F_B$. Программа элюирования задается в "Таблице градиента". Принцип формирования бинарного "градиента" ясен из рисунка.

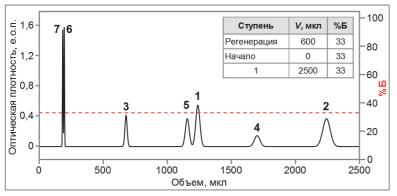


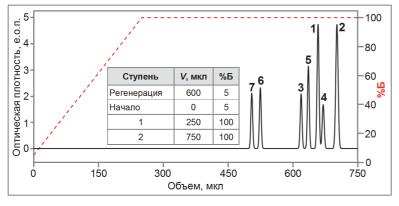
При задании программы элюции необходимо учитывать, что шприцы насосов имеют ограниченные объемы ("А" — 2300 мкл, "Б" — 2500 мкл), а объем "задержки" градиента (объем жидкости в смесителе и в капиллярах между точкой смешивания и колонкой) составляет 290 мкл.

Сравним результаты эмулированных разделений в изократическом и в градиентном режимах пробы раствора "7 веществ" в этаноле (в скобках указана их

концентрация в мкг/мл): **1**- 1-Нафтол (50); **2**- 1-Нитронафталин (50); **3**- 2-4-Динитрофенол (100); **4**- 4-Нитротолуол (100); **5**- Бензанилид (100); **6**- Кофеин (50); **7**- Теобромин (50). Состав элюента подбирался таким, чтобы разрешение соседних пиков $R_{Sn,n+1}$ было не хуже 1,1.

Из приведенных ниже хроматограмм видно, что в результате использования градиентного элюирования время анализа сократилось в 3 раза.





Подбор состава элюента, обеспечивающего в изократической обращенно-фазовой хроматографии минимальное время анализа при заданном разрешении пиков требует проведения серии экспериментов, в которых на последних этапах концентрация сильного компонента (Б) изменяется с шагом 1%. Эта процедура отнимает довольно много времени и представляется целесообразной лишь в тех случаях, когда разрабатывается методика, предназначенная для серийного анализа.

Ускорить оптимизацию методики можно с помощью компьютерных программ, алгоритмы которых подобны тем, что лежат в основе Тренажера.

Еще больше времени отнимает экспериментальная оптимизация градиентной хроматографии. Она сводится к подбору оптимального односегментного линейного градиента или, реже, градиента более сложной формы. И в этих случаях применение вычислительных программ, эмулирующих хроматографический процесс. многократно ускоряет работу. Для эмуляции предварительно экспериментально находят ряд констант, определяющих хроматографические параметры веществ-аналитов. Оптимизация может выполняться автоматически или "вручную". Ручной оптимизатор входит в состав Тренажера, и далее мы покажем, как он работает.

20. Программа "Оптимизатор градиента и температуры"

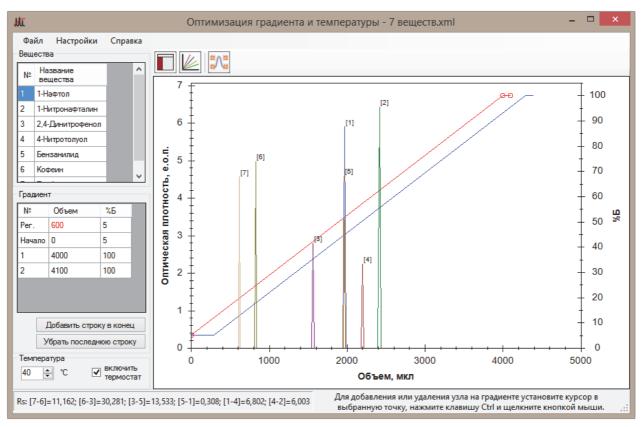
Вход в программу осуществляется щелчком по кнопке "Оптимизатор градиента и температуры" или по иконке Работа начинается с загрузки файла образца *.xml, который записывается после приготовления образца. Состав образца, с которым мы работали в предыдущем разделе, записан в файле ...\ChromaTrainer\Samples\7 веществ.xml\).

Открывающаяся хроматограмма эмулируется в установленных по умолчанию условиях: объем пробы 10 мкл; λ = 210 нм; T = 40°C; линейный градиент концентрации ${\bf 5}$ с параметрами из таблицы "Градиент". Нумерация пиков соответствует номерам веществ в таблице "Вещества". Красная линия на графике соответствует значениям "% ${\bf 5}$ " в зависимости от объема, как установлено в таблице "Градиент". Начало и конец каждой ступени градиента (узловые точки) отмечены значками " ${\bf o}$ ". Синяя линия — значения "% ${\bf 5}$ " с учетом "задержки" градиента (объем смесителя и капилляра, соединяющего его с колонкой). Объем "задержки" в программе равен 290 мкл (как в хроматографе "Милихром A-02") и изменен быть не может. В строке под хроматограммой приведены значения разрешений всех соседних пиков ($R_{{\bf S}n,n+1}$).

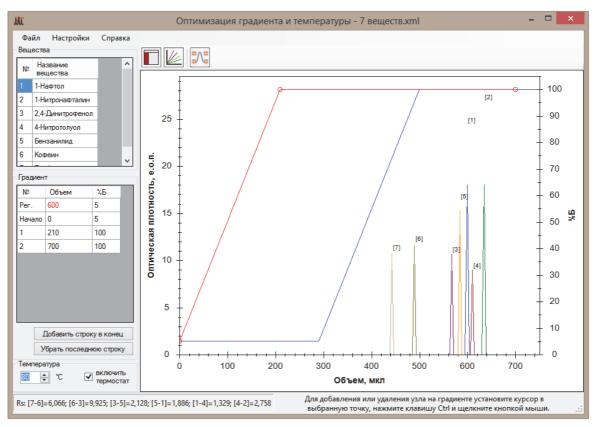
Оптимизация программы элюирования заключается в поиске формы градиента концентрации компонента элюента $\mathbf{5}$ с целью минимизации времени анализа (минимизация объема удерживания последнего пика) при условии, что значения $R_{Sn,n+1}$ должны быть не меньше требуемой величины (например, $R_S \ge 1,2$). Форму градиента можно изменять либо "табличным" способом (редактирование таблицы "Градиент"), либо "графическим", передвигая узловые точки курсором при нажатой левой клавише мыши. Чтобы добавить или удалить узловую точку на красной линии, надо установить курсор в соответствующее место на красной линии, нажать на клавиатуре кнопку Ctrl и щелкнуть левой клавишей мыши. Изменение формы градиента на хроматограмме и в таблице происходит одновременно. После изменения формы градиента новая хроматограмма эмулируется практически мгновенно, и также быстро пересчитываются значения $R_{Sn,n+1}$. Минимальную концентрацию $\mathbf{5}$ нельзя выбирать менее 5%, так как хроматограммы при низком содержании в элюенте органического растворителя (ацетонитрила) эмулируются со значительной погрешностью.

Внимание! Необходимо помнить, что объемы шприцевых насосов хроматографа ограничены (насос **A** – 2300 мкл, насос **Б** – 2500 мкл). Если градиент из-за ограничения объемов насосов реализован быть не может, над хроматограммой появляется сообщение: "Объем заданного градиента превышает объемы насосов "Милихрома A-02".

Далее на рисунках показаны "исходная" и "оптимизированная" хроматограммы. На оптимизированной хроматограмме наихудшее разрешение, равное 1,329, имеет пара пиков "1-4". Температура повышена с 40 до 80°С, чтобы, снизив вязкость подвижной фазы, можно было увеличить скорость потока.



Исходная хроматограмма пробы раствора "7 веществ", эмулированная в условиях "по умолчанию".



Оптимизированная хроматограмма пробы раствора образца "7 веществ".

Очевидно, что найденные условия нельзя назвать "оптимальными" в строгом понимании термина. Назначение программы "Оптимизатор" заключается, скорее, не в самой оптимизации, а в получении определенных "практических" навыков, необходимых для решения проблем, связанных с "улучшением" хроматографического анализа.

Перенесем полученные условия анализа в программу АльфаХром-Т, запишем хроматограмму раствора "7 веществ" (объем пробы 2 мкл) при скорости потока 700 мкл/мин, загрузим ее в программу АльфаСпектр и вычислим значения Rs для всех пиков. Минимальная величина (R_S =1,24) относится к паре "1-Нафтол / 4-Нитротолуол" и она удовлетворяет заданному нами критерию оптимизации. Продолжительность анализа сократилась до 1 мин, что уже характерно, скорее, не для ВЭЖХ, а для СВЭЖХ. Эта аббревиатура используется в русскоязычной литературе по аналогии с аббревиату-рой UHPLC - Ultra High Performance (Pressure) Liquid Chromatography. Интересно отметить, что если реализация мето-да СВЭЖХ требует давления 50-150 МПа. то в нашем случае, благодаря оптимизации, оно составило всего 7.1 МПа.

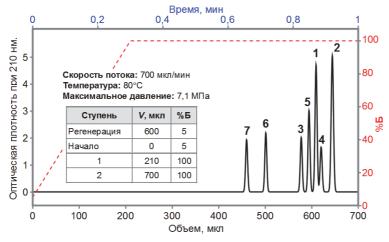


Таблица пиков (канал разметки: 210 нм):

Условные обозначения:

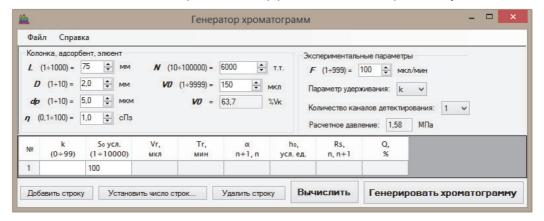
 V_R - объем удерживания

 $R_{\rm S}$ - разрешение пиков n и n+1

Пик №	<i>V_R</i> , мкл	Rs	Вещество
7	460	4,83	Теобромин
6	501	9,03	Кофеин
3	578	1,96	2-4-Динитрофенол
5	594	1,74	Бензанилид
1	609	1,24	1-Нафтол
4	620	2,56	4-Нитротолуол
2	644	-	1-Нитронафталин

21. Программа "Генератор хроматограмм"

Вход в программу осуществляется щелчком по кнопке "Генератор хроматограмм" или по иконке ... Программа предназначена для вычисления взаимосвязанных хроматографических параметров, о которых говорится в *Приложениях 3, 4, 5, 7, 8, 10 и 11*. С ее помощью можно генерировать хроматограммы веществ с задаваемыми значениями удерживания и площадей пиков, меняя размеры, эффективность и мертвый объем колонки, вязкость подвижной фазы, скорость потока, количество каналов детектирования. Интерфейс пользователя прост и интуитивно понятен:



По умолчанию в разделе "Колонка, адсорбент, элюент" установлены параметры колонки хроматографа "Милихром А-02". Подробное описание программы вызывается из пункта меню "Справка".

Продемонстрируем работу программы на примере решения задачи:

Определить чистоту (гомогенность) пиков, если величина их разрешения $R_{Sn,n+1} = 1,2$

Решение. Так как в Генераторе хроматограмм параметр "Разрешение пиков" ($R_{Sn,n+1}$) является "вычисляемым", а не "устанавливаемым", то сначала найдем значения факторов удерживания k (или объемов удерживания V_R , или времен удерживания T_R) двух веществ, при которых их разрешение составит 1,2. Для этого введем в колонку "k" значения k_1 = 1,00 и k_2 = 2,00, а в ячейки колонки "Площадь пика" (S_{0ycn}) одинаковые величины (например, 100) и произведем вычисление параметров, щелкнув по кнопке "Вычислить": $R_{S0,pth}$ = 7,75.

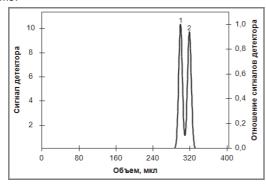
Nº	k (0÷99)	So усл. (1÷10000)	Vr, мкл	Tr, мин	α n+1, n	ho, усл. ед.	Rs, n, n+1	Q, %
1	1	100	300	3		10,301	1,201	99,166
2	1,128	100	319,2	3,192	1,13	9,681		99,336
Nº	k (0÷99)	S₀ усл. (1÷10000)	Vr, мкл	Tr, мин	α n+1, n	ho, усл. ед.	Rs, n, n+1	Q, %
1	1	10000	300	3		1030,065	1,201	99,973

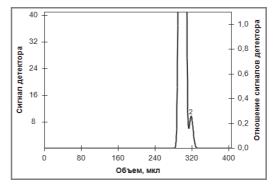
Так как по условию задачи разрешение пиков должно быть меньше, начнем уменьшать величину k_2 до тех пор, пока $R_{S1,2}$ не станет близким к 1,2. Решение задачи получаем в колонке "Чистота пика" (Q).

Это решение является верным при условии, что $S_1 = S_2$. Если площадь пика 1 будет в 100 раз больше площади пика 2, то

чистота (гомогенность) второго пика заметно ухудшится, хотя разрешение пиков сохранится таким же.

Кроме вычисления параметров, программа позволяет генерировать соответствующие хроматограммы после щелчка по кнопке "Генерировать хроматограмму". Хроматограммы, полученные для параметров из приведенных таблиц, показаны ниже.





Милихром А-02

•жидкостный•высокоэффективный•автоматический•экономичный•портативный **ХРОМАТОГРАФ**^{1, 2)}





ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова"

630090, Новосибирск, Академгородок, ул. Инженерная, д.28

Тел/Факс:.+7 (383) 207-84-71 Эл. почта: info@econova.nsk.su

Сайт: www.econova.ru

• ДЕТЕКТОР

Двухлучевой спектрофотометр
Спектральный дипазон 190-360 нм
Одновременная детекция на 1-8 длинах волн
Объем ячейки 1.2 мкл
Флуктуация нулевого сигнала <0.0002 е.о.п./см
Дрейф нулевого сигнала <0.0001 е.о.п./см час

HACOC

Двухшприцевый, градиентный Скорость подачи 2-999 мкл/мин Максимальное давление 8 МПа Градиент из 1-20 линейных участков

• ДОЗАТОР

Автоматический Количество пробирок 46 Дозируемый объем 1-99 мкл Пробирки из стекла на 200 мкл Пробки из полиэтилена

КОЛОНКА В ТЕРМОСТАТЕ

Колонка из нержавеющей стали 2х75 мм Эффективность не менее 4500 т.т. Термостатирование при 35-90°С Шаг изменения температуры 1°С Погрешность термостатирования 0.1°С

• ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

Windows® Vista/7/8 АльфаХром®, АльфаСпектр®

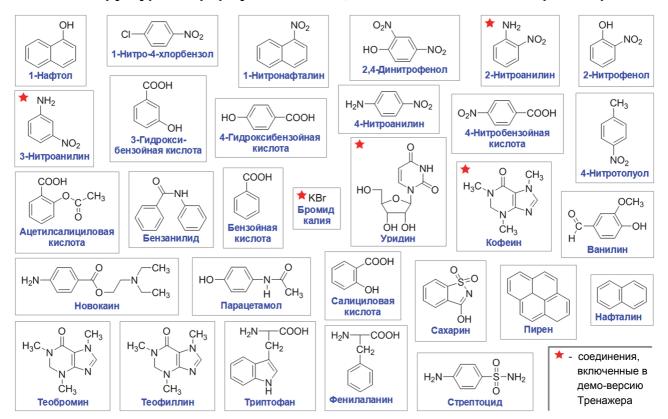
Альфалром , Альфаспектр

• **PA3MEPЫ**, **BEC** (без компьютера) 53 x 21 x 32 см. 17 кг. 130 BA

Baram G. I. Portable liquid chromatograph for mobile laboratories. I. Aims. J. Chomatogr. A, 1996, V.728, No.1-2, pp.387-399.

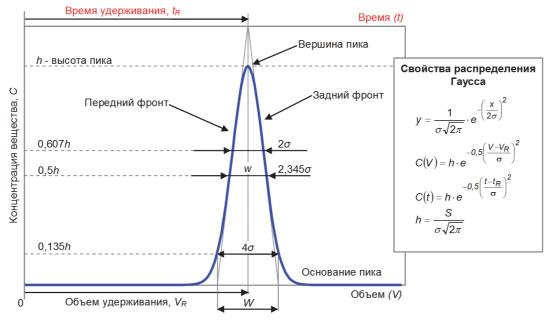
²⁾ Барам Г. И. Развитие метода микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии и его применение для исследования объектов окружающей среды. В кн. "100 лет хроматографии", (ред. Руденко Б. А.), М., изд. "Наука", 2003, сс. 32-60.

Названия и структурные формулы веществ, включенные в состав Тренажера



Хроматографический пик

"Идеальный" хроматографический пик описывается функцией Гаусса и представляет собой кривую, показанную на рисунке:



t_R – время удерживания вещества

 V_R – объем удерживания вещества

С – текущая концентрация вещества в подвижной фазе

h – высота пика

 σ – стандартное отклонение гауссова пика

w – ширина пика на уровне 0,5*h*

W – ширина основания пика

S – площадь пика

Хроматограмма. Удерживание вещества в колонке¹⁾

Хроматограмма – функция концентрации веществ в элюате от времени или от объема.



- V_0 равен объему находящейся в колонке подвижной фазы
- $V_0(t_0)$ объем (время) удерживания вещества, которое не адсорбируется в колонке
- Величины k и α не зависят от объема колонки, от эффективности колонки и от скорости потока подвижной фазы

Связь между объемом, временем и скоростью потока

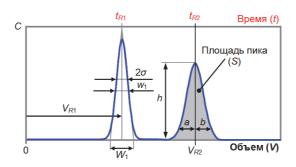
V – объем, t – время, F – объемная скорость потока элюента, U – линейная скорость потока элюента вдоль колонки (скорость движения фронта элюента вдоль колонки), s – площадь поперечного сечения колонки.

$$V = F \cdot t$$
, $V_R = F \cdot t_R$, $V_0 = F \cdot t_0$, $U = \frac{F}{s}$, $t_0 = \frac{L}{U}$.

¹⁾ Даванков В. А. (Редактор). Хроматография. Основные понятия. Терминология. Сборники научно-нормативной терминологии. Выпуск 114. М., 1997, 48 с.

(2)

Эффективность колонки, разрешение пиков, асимметрия пиков



Эффективность колонки, теоретические тарелки

$$N = \left(\frac{V_R}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \approx 5.54 \cdot \left(\frac{V_R}{w}\right)^2 \approx 16 \cdot \left(\frac{V_R}{w}\right)^2 \approx 2\pi \cdot \left(\frac{V_R \cdot h}{S}\right)^2 \tag{1}$$

Высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)

$$H = L/N$$
, где $L -$ длина колонки

Приведенная ВЭТТ

$$\overline{H} = \frac{H}{d_p}$$
, где d_p – диаметр зерна адсорбента (3)

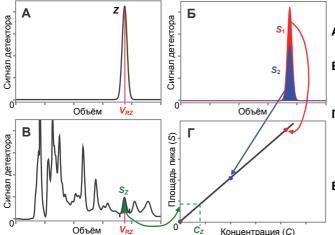
Коэффициент разделения (разрешения) пиков 1 и 2

$$R_{1,2} = \frac{2(V_{R2} - V_{R1})}{W_1 + W_2} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$
(4)

Асимметрия хроматографического пика (на уровне 10% h): $A_{10\%} = b/a$. В Фармакопеях Британии, Европы и США асимметрия пиков измеряется на уровне 5% h как $A_{5\%} = (a + b)/2a$.

Принцип хроматографического анализа

Производя какие-либо измерения, мы часто даже не задумываемся, что получаемые значения являются относительными, так как основаны на сравнении измеряемых величин с соответствующими Стандартами. Хроматографический метод анализа не является исключением и тоже относителен. Отличается он от большинства других измерительных процедур тем, что средство измерения – хроматограф – исследователь калибрует самостоятельно. Этапы хроматографического анализа показаны на рисунке:



Калибровка хроматографа

- **A** Определение объема удерживания вещества **Z** (V_{RZ}) и нахождение погрешности его значения.
- Б Определение площадей пиков (S₁, S₂) вещества Z для проб растворов с разными концентрациями и нахождение их погрешностей.
- Г Зависимость площади пика вещества Z от его концентрации (C) $S = K \cdot C$, где K калибровочный коэффициент. Нахождение доверительного интервала ($\pm \delta$).

Анализ

В – Хроматограмма пробы исследуемого раствора. Веществу **Z** соответствует пик с объемом удерживания $V_R = V_{RZ}$. Его площадь S_Z соответствует концентрации вещества **Z**, равной $C_Z \pm \delta$.

Погрешности определения удерживания и площади пика вещества в жидкостной хроматографии зависят от множества факторов, начиная от подготовки образца и кончая обработкой результатов^{1,2)}. Типичная погрешность ВЭЖХ-анализа составляет 2-5%.

¹⁾ Скотт Р. П. У. Количественный анализ методом жидкостной хроматографии. В книге "Количественный анализ хроматографическими методами", Э. Кэц (Ред.). *М., изд. "Мир", 1990, с. 57-83*.

²⁾ Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan W. Introduction to modern liquid chromatography, 3rd Edition. John Wiley & Sons, 2010, p. 499-530.

Давление в ВЭЖХ

Высокоэффективную жидкостную хроматографию в 70-х годах прошлого века часто называли "хроматографией под высоким давлением", трансформируя аббревиатуру *HPLC* (*High Performance Liquid Chromatography*) в *High Pressure Liquid Chromatography*. Использование насосов высокого давления было обусловлено большим гидродинамическим сопротивлением колонок, заполненных микрозернистым адсорбентом для достижения их высокой эффективности. Связь перепада давления вдоль колонки с параметрами хроматографической системы хорошо описывается эмпирическим уравнением¹⁾:

$$\Delta P \approx 21 \cdot \frac{F \cdot L \cdot \eta}{d_p^2 \cdot D^2},\tag{5}$$

где ΔP – перепад давления вдоль колонки (МПа); F – скорость потока подвижной фазы (мл/мин); L – длина колонки (мм); η – вязкость подвижной фазы (сП); d_p – размер частиц адсорбента (мкм); D – диаметр колонки (мм).

Принята следующая классификация жидкостной хроматографии по отношению к давлению:

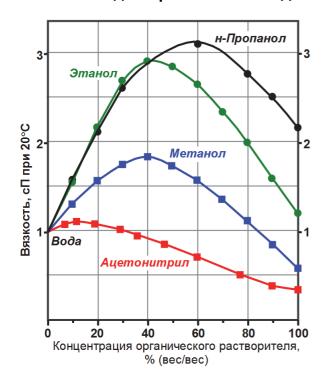
- ЖХ низкого давления ∆Р до 0,2 МПа (d_p > 50 мкм)
- ЖХ среднего давления ∆Р до 5 МПа (d_p =15 40 мкм)
- ЖХ высокого давления (*HPLC*, ВЭЖХ) ΔP до 40 МПа (d_p =3 10 мкм)
- ЖХ сверхвысокого давления (*UHPLC*, CBЭЖХ) ΔP до 150 МПа (d_0 =1.5 2 мкм)

В таблице приведены вычисленные значения ΔP для колонок $\varnothing 2$ х 75 мм. Элюент – вода (η = 1 сП при 20°C).

Nº	<i>d_p</i> , мкм	<i>F</i> , мл/мин	∆Р, МПа
1	5,0	0,2	3,15
2	1,7	0,2	27,3
3	1,7	1,0	136

¹⁾ Endele R., Halasz I., Unger K. Influence of the partical size (5-35 μm) of spherical silica on column efficiencies in HPLC. *J. Chromatogr.*, 1974, Vol. 99, p. 377-393.

Вязкость водно-органических подвижных фаз¹⁾

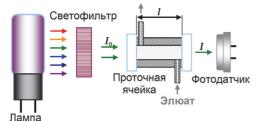


Растропитоли	$T_{\scriptscriptstyle{K\!M\!\Pi}},$	η (0	:П) при	тем пе	ратуре	,°C
Растворитель	°C	0	25	50	75	100
Ацетонитрил	81.6	0.40	0.37	0.28	0.23	-
Вода	100.0	1.79	0.89	0.55	0.38	0.28
Гексан	68.7	0.41	0.30	0.24	-	-
Метанол	64.5	0.82	0.55	0.40	-	-
Этанол	78.3	1.79	1.07	0.69	0.48	-
2-Пропанол	82.4	4.60	2.25	1.03	-	-

¹⁾ Van der Wal Sj. Low Viscosity Organic Modifiers in Reversed-Phase HPLC. Chromatographia, 1985, V. 20, No. 5, pp. 274-278.

Фотометрическое детектирование

Самыми распространенными детекторами в ВЭЖХ являются фотометры (спектрофотометры), работающие в Уфобласти спектра (190-350 нм). Поглощение растворами веществ излучения в этом спектральном диапазоне обусловлено электронными переходами $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$ в результате возбуждения электронов фотонами. Схема простейшего фотометрического детектора показана на рисунке. Поглощение раствором вещества (элюатом) монохроматического света с длиной волны λ , выделенного светофильтром, описывается законом Бугера-Ламберта-Бера:



$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon_{\lambda} \cdot C \cdot l}, \tag{6}$$

где I – интенсивность света, прошедшего через ячейку; I_0 – интенсивность света, падающего на ячейку; ε_λ – коэффициент экстинкции раствора при длине волны λ ; C – концентрация вещества в растворе; l – длина кюветы.

Отношение $T=I/I_0$ называют "пропусканием" света, а величину, линейно связанную с концентрацией — оптической плотностью (A или D):

$$A_{\lambda} = -lg \ T = \varepsilon_{\lambda} \cdot C \cdot l. \tag{7}$$

Оптическая плотность имеет условную размерность "единица оптической плотности" (е.о.п.).

Коэффициент экстинкции ε_{λ} равен оптической плотности раствора с C = 1, измеренной в ячейке с l = 1. Если C = 1 М и l = 1 см. то ε_{λ} будет иметь размерность [л·М⁻¹·см⁻¹].

В качестве хроматографических детекторов фотометры в настоящее время практически не применяются. Им на смену пришли спектрофотометры двух типов, позволяющие выбирать любую длину волны в УФ-диапазоне спектра и в видимой области до 800 нм. В детекторах первого типа выбор длины волны осуществляется поворотом дифракционной решетки в заданное положение. Монохроматоры во втором типе детекторов содержат неподвижную дифракционную решетку и линейку из 512 или 1024 фотодиодов. Каждый фотодиод измеряет оптическую плотность при своей длине волны, детектор является многоканальным и позволяет регистрировать полные спектры поглощения. Технические характристики детекторов включают в себя уровень шумов (0,0001-0,0001 е.о.п.), дрейф нулевой линии (0,0001-0,001 е.о.п./час), точность установки длины волны (0,1-1 нм), ширину оптической щели (5-10 нм), быстродействие (1-100 измерений/с), линейность (от 0 до 1,5-2 е.о.п.), объем ячейки (1-10 мкл) и ее длину (1-50 мм). "Стандартная" длина ячейки равна 10 мм, и значения оптической плотности на хроматограммах соответствуют именно такой ячейке. Для более короткой или более длинной ячейки величины оптической плотности изменяются согласно уравнению (7).

Исключение из этого правила составляют детекторы хроматографа "Милихром A-02" и его виртуальной версии, в которых длина ячейки равна 1,56 мм, но значения оптической плотности приводятся к кювете длиной 10 мм.

УФ-детекторы позволяют анализировать очень широкий круг соединений, в состав которых входят различные хромофоры (см. Таблицу). В качестве прозрачных в УФ-области спектра растворителей и подвижных фаз применяются вода, спирты, ацетонитрил, тетрагидрофуран, гексан, хлористый метилен и др.

Методологические аспекты использования УФ-детекторов в жидкостной хроматографии, включая их метрологические возможности подробно рассмотрены в ряде монографий^{1,2)}.

Максимумы поглощения и молярные экстинкции некоторых изолированных хромофоров

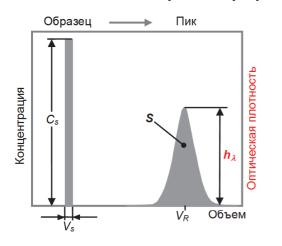
Bruno T. J., Svoronos P. D. N. Handbook of basic tables of chemical analysis, 3rd Edition. *Taylor and Francis Group, LLC, 2011, p. 365-366.*

Группа	λ _{макс} , НМ	<i>€М</i> , макс	Группа	А _{макс} , НМ	<i>€М</i> , макс
-0-	185	100	-(C=C) ₂ -(acyclic)	220	21000
-S-	194	4600	-(C=C) ₃ -	260	35000
-NH ₂	195	2800	-(C=C) ₄ -	300	52000
-CONH ₂	<210	-	-(C=C) ₅ -	330	118000
-SH	195	1400		184	46700
-S-S-	194	5500		202	6900
-Br	208	300		255	170
-1	260	400			
-C≡N	160	-		246	20000
-C≡C-	178	6000			
-SO ₂ -	180	-		220	112000
N-OH	190	5000		275	5600
>C=N-	190	5000		312	175
-C=C-	190	8000		252	199000
>C=O	195	1000			
>C=S	205	>5000		375	7900
-COOR	205	50		174	80000
-CHO	210	>5000	/ `N	195	6000
-COOH	205	50-70	\ <u>_</u> /	251	1700
>S→O	210	1500		227	37000
-NO ₂	210	>5000		270	3600
-ONO	225	1500	N N	314	2750
-N=N-	330	3-25		218	80000
-N=O	302	100		266	4000
-ONO ₂	270	12	N	317	3500

¹⁾ **Бражников В. В.** Детекторы для хроматографии. *М., "Машиностроение", 1992, 320 с.*

²⁾ Scott R. P. W. Chromatographic Detectors. Design, Function, and Operation. Marcel Dekker, Inc., 1996, 545 p.

Высота и площадь хроматографического пика



$$h_{\lambda} = \frac{S_{\lambda}}{\sigma\sqrt{2\pi}} = \frac{\varepsilon_{M}^{\lambda} \cdot C_{s} \cdot I \cdot V_{s} \sqrt{N}}{M \cdot V_{0} \cdot (1+k)\sqrt{2\pi}}$$
(e.o.n.) (8)

S_{λ}	площадь пика при длине волны λ	е.о.п. • мкл
σ	стандартное отклонение гауссова пика	мкл
$\varepsilon^{\lambda}_{M}$	коэффициент молярной экстинкции аналита при длине волны λ	л ⁻¹ ·М·см ⁻¹
Cs	концентрация раствора аналита	мг/мл
1	длина оптического пути ячейки	СМ
V_s	объем инжектируемого раствора аналита	мкл
N	эффективность колонки	т. т.
М	молекулярная масса аналита	Γ
V _o	мертвый объем колонки	МКЛ
k	фактор удерживания аналита	-

1.6 — — — — — — — — — — — — — — — — — — —		NH ₂	2
ε. M. 3. 10-4	210		\Rightarrow
0.4		280 300 320 34	0 360

Длина волны, нм

210 &M	9100	л ⁻¹ ·М·см ⁻¹
C₅	0,1	мг/мл
1	1	СМ
Vs	2	мкл
Ν	6000	МКЛ
М	138,1	Г
V_0	150	мкл
k	1	-

 $h_{210 \text{ (выч.)}} = 1,35 \text{ e.o.п.}$ $h_{210 \text{ (эксп.)}} = 1,35 \text{ e.o.п.}$

Многоканальное детектирование в ВЭЖХ. Базы данных "ВЭЖХ-УФ"

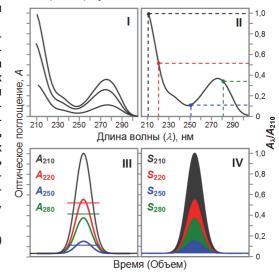
Идентификация пика вещества на хроматограмме относительно удерживания пика его стандарта является в хроматографии общепринятым способом, но он хорош лишь в тех случаях, когда в образце мало компонентов и его происхождение известно. При анализе многокомпонентных и неизвестных образцов вероятность ошибочной идентификации существенно возрастает, что требует привлечения дополнительных критериев правильности. Таковыми могут быть данные, получаемые в результате многоканального детектирования, важным условием которого является линейная зависимость сигнала по каждому каналу (A_i) от концентрации вещества-аналита (C), т.е. $A_i = K_i \cdot C$, где K_i — коэффициент чувствительности детектора на канале i. В полной мере этому условию отвечают диодно-матричные спектрофотометры, регистрирующие оптическое поглощение одновременно по сотням каналов, и спектрофотометры с быстро перестраивающимся монохроматором (квазиодновременное детектирование) с последующим приведением результатов, полученных в одном цикле измерений, к одному времени (к одной концентрации) путем математических вычисле-

ний. Такой детектор установлен в хроматографе "Милихром А-02" и эмулирован в виртуальном хроматографе.

Многоволновая детекция дает возможность получать нормированные спектры веществ, которые в совокупности с величиной удерживания многократно повышают надежность идентификации пиков на хроматограмме. Суть этого подхода проиллюстрирована на рисунках справа. На рис. І приведены спектры растворов вещества \mathbf{Z} с разными концентрациями. Такие спектры мы получим в разных точках хроматографического пика, если будем быстро записывать их во время прохождения зоны вещества \mathbf{Z} через кювету детектора. Чтобы сравнить спектры друг с другом, их надо нормировать, т. е. значения оптических плотностей при всех длинах волн разделить на оптическую плотность при одной, например, при 210 нм. Поскольку все три спектра принадлежат одному веществу, то в результате мы получим один нормированный спектр (рис. ІІ), который не зависит от концентрации раствора, так как

$$\frac{A_{\lambda 1}}{A_{\lambda 2}} = \frac{\varepsilon_{\lambda 1} \cdot \mathbf{C} \cdot \mathbf{I}}{\varepsilon_{\lambda 2} \cdot \mathbf{C} \cdot \mathbf{I}} = \frac{\varepsilon_{\lambda 1}}{\varepsilon_{\lambda 2}} = \mathbf{R} - \mathbf{const} , \qquad (9)$$

где ε_i – экстинкция вещества **Z** при длине волны λ , а I – длина кюветы.

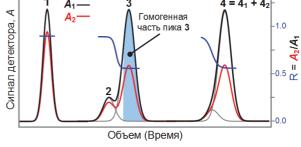


На рис. **III** показан хроматографический пик вещества **Z**, полученный при детекции при длинах волн 210, 220, 250 и 280 нм. На всем протяжении пика он представляет собой раствор только одного вещества, поэтому все три спектральные отношения $-A_{220}/A_{210}$, A_{250}/A_{210} и A_{280}/A_{210} – постоянны и численно равны соответствующим спектральным отношениям, отмеченным на нормированном спектре (рис. **II**). Нетрудно показать, что для площадей пиков при этих длинах волн, выделенных цветом на рис. **IV**, будут соблюдаться равенства:

$$\frac{A_{220}}{A_{210}} = \frac{S_{220}}{S_{210}} = R_1, \quad \frac{A_{250}}{A_{210}} = \frac{S_{250}}{S_{210}} = R_2, \quad \frac{A_{280}}{A_{210}} = \frac{S_{280}}{S_{210}} = R_3.$$
 (10)

Профиль спектральных отношений вдоль пика часто позволяет контролировать его чистоту (однородность, гомогенность)^{1,2)}. Так, глядя на хроматографические пики веществ на рисунке справа, полученные при двухволновой детекции, можно сказать:

- пик 1 гомогенный;
- пики **2** и **3** разделены плохо и лишь часть пика **3**, залитая голубым, гомогенна, потому что ей соответствует участок кривой спектрального отношения, на котором *R* = *const*;
- пик 4 состоит минимум из двух пиков (4₁ и 4₂), о чем свидетельствует кривая спектрального отношения.



Если многоволновой детектор обладает долговременной ста-

бильностью и нормированные спектры могут сравниваться друг с другом, то коллекцию таких спектров можно назвать "спектральной базой данных" и применять её для идентификации веществ на хроматограмме. Когда для детекции используется не более 8 длин волн, то База представляет собой "таблицу спектральных отношений". Такая "табличная" форма Базы данных принята в методиках, реализованных на хроматографе "Милихром А-02" с восьмиволновой детекцией^{3,4}).

¹⁾ **Хубер Л.** Применение диодно-матричного детектирования в ВЭЖХ. *М., изд. "Мир", 1993, с. 18.*

²⁾ Papadoyannis I. N., Gika H. G. Diode Array Detectors: Peak Identification. Encyclopedia of Chromatography, 3rd Edition. Cazes J. (Ed.), Taylor and Francis Group, LLC, 2010, Vol. 1, p. 606-611.

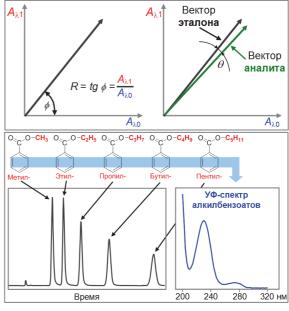
^{3.4)} Методики № ФР.1.31.2003.00950 и № ФР.1.31.2003.00951 (см. в разделе Тренажера "Документация").

Если для детектирования используется больше 6-8 длин волн, то табличная База данных становится неудобной, да и компьютерной программе сравнивать спектр аналита с эталонными спектрами проще, если они представлены в векторной форме. Векторное представление для двухволной детекции показано на рисунке. Сравнение спектров ана-

лита со спектрами эталонов сводится к вычислению угла θ между их векторами и, если θ = 0°, то спектры совпадают полностью. В методике "База данных ВЭЖХ-УФ" для хроматографа "Милихром А-02" совпадение спектров считается удовлетворительным, если $\theta \le 2^{\circ 1}$.

Отметим, что идентификация веществ только по спектральной базе данных весьма ненадежна. Поглощение молекул в УФ-области спектра 190-350 нм определяется лишь электронными переходами $\pi \to \pi^*$ и $n \to \pi^*$, а σ -электроны поглощают в более коротковолной области. Поэтому спектры веществ, имеющих одинаковые группыхромофоры, но разные непоглощающие радикалы (например, алифатические) будут иметь одинаковые спектры, как показано на рисунке для алкилбензоатов. Однако вещества с разными структурными формулами различаются по удерживанию на колонке и добавление V_R к набору спектральных отношений — $[V_{Ri}, R_{i1}, R_{i2}, ..., R_{in}]$ — делает идентификацию по Базе данных "ВЭЖХ-УФ" намного более достоверной.

Базы данных "ВЭЖХ-УФ", несмотря на их очевидные достоинства 2 , пока не получили должного распространения, так как формировать их и поддерживать приходится самому химику-аналитику. Коммерчески доступной является лишь База данных "БД-2003" для хроматографа "Милихром А-02", поставляемая ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова" в виде набора — колонка, элюент $\bf A$, тест-раствор



для валидации, файл с калибровочными данными для веществ-эталонов для программы АльфаСпектр. С некоторыми возможностями Базы "БД-2003" можно познакомится при решении Задач в рамках этого Практикума.

¹⁾ Методика № ФР.1.31.2006.02966 (см. в разделе Тренажера "Документация").

²⁾ Herzler M., Herre S., Pragst F. Selectivity of Substance Identification by HPLC–DAD in Toxicological Analysis using a UV Spectra Library of 2682 Compounds. *Journal of Analytical Toxicology*, 2003, Vol. 27, p. 233-242.

Обращенно-фазовая хроматография

Обращенно-фазовая жидкостная хроматография – распределительная хроматография на стационарных фазах, которые менее полярны, чем мобильные. Наибольшее распространение в ВЭЖХ получили фазы, представляющие "щетку" алкильных радикалов – $C_{18}H_{37}$, ковалентно присоединенных к силикагелю, как схематично показано на рисунке.

Неподвижная фаза Подвижная фаза Аналит
Адетонитрил Вода

Механизм хроматографии на фазах "С18" можно представить, исходя из следующих соображений:

- подвижной фазой является раствор органического растворителя в воде;
- молекулы вещества-аналита, находясь в системе двух растворителей, распределяются между ними в соответствии с его растворимостью;
- отношение концентраций аналита в неподвижной фазе (C_S) к его концентрации в подвижной фазе (C_M) представляет собой константу его распределения в двухфазной системе растворителей $K_{S/M} = C_S/C_M$, которая прямо связана с фактором удерживания k.

Константа $K_{S/M}$, отражая меру "гидрофобности" вещества, является "гипотетической" и найти её значение не представляется возможным. Мерой гидрофобности принято считать константу распределения вещества в системе двух несмешивающихся жидкостей "вода — H-октанол" ($K_{O/M}$), которая определяется экспериментально или вычисляется с помощью какой-либо компьютерной программы (например, " $ACD/PhysChem\ Profiler"$ — $Advanced\ Chemistry\ Develop$

ment, Inc., Торонто, Канада). Для нейтральных веществ $K_{O/W}$ принято обозначать буквой "P", а для ионизующихся – буквой "D" и $D = K_{O/W} = f(pH)$. Зависимости вида $lg \ k = a \cdot lg \ P + b$ (а и b – константы) весьма успешно используются для предсказания удерживания веществ на обращенных фазах, особенно для веществ-гомологов 1.

¹⁾ Valko K. Retention prediction of pharmaceutical compounds. *In "Retention and selectivity in liquid chromatography. Prediction, standardisation and phase comparisons. Smith R. M. (Editor). Elsevier Science B.V., 1995, p. 47-92.*

Пример типичной корреляции между *Ig P* и *Ig k* для гомологов – эфиров бензойной кислоты – приведен на рисунке.

3,6-

2,4-

Колонка: Ø2х75 мм

Температура: 45°C

Детектор: 250 нм

Адсорбент: Nucleosil 5-C18

Элюент: CH₃OH – H₂O (70:30)

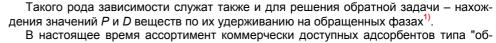
Скорость потока: 150 мкл/мин

Проба: 2 мкл раствора веществ

в метаноле (по 0.5 мг/мл)

-Пропил

8.0



В настоящее время ассортимент коммерчески доступных адсорбентов типа "обращенная фаза" составляет несколько тысяч названий. Большая часть предназначена для разделения низкомолекулярных веществ, и эти фазы имеют близкие свойства. В виртуальном хроматографе применяется колонка с обращенной фазой *ProntoSIL*-120-5-C18 *AQ* (*Bischoff Chromatography*, Германия), основой которой является объемно-пористый силикагель (частицы сферической формы диаметром 5 мкм, размером пор 120 Å и площадью поверхности 300 м²/г). Содержа-

размером пор 120 Å и площадью поверхности 300 м²/г). Содержание углерода составляет 14%, остаточные силанолы дезактивированы (endcapped). Относительно невысокая плотность радикалов С18 на поверхности силикагеля позволяет использовать элюенты с низкой концентрацией органического растворителя, в которых обращенные фазы, содержащие более 16% углерода "коллапсируют", как показано на рисунке, теряя при этом свою емкость многократно²). Промывка колонки водноорганическим элюентом полностью восстанавливает её свойства.

Зависимость фактора удерживания вещества от концентрации органического растворителя в бинарном элюенте удовлетворительно описывается уравнением³⁾

$$\lg k = \lg k_W - \mathcal{S}\phi,\tag{11}$$

где k_W – фактор удерживания аналита в воде; S – константа ана-

лита для бинарного элюента; ϕ – объемная доля растворителя в элюенте. Эта зависимость лежит в основе ряда программ, включая наш "Виртуальный хроматограф", предсказывающих удерживание веществ в разных элюентах.

¹⁾OPPTS 830.7570 Partition coefficient (*n*-octanol/water), estimation by liquid chromatography. *Product Properties Test Guidelines. United States Environmental Protection Agency, EPA 712–C–96–040, August 1996.*

²⁾ **Kazakevich Yu., Lobrutto R.** Stationary phases. In "HPLC for Pharmaceutical Scientists", Kazakevich Yu. & Lobrutto R. (Editors.), Wiley-Interscience, 2007, p. 75-138.

³⁾ Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W. Introduction to modern liquid chromatography, 3rd Edition. John Wiley & Sons, Inc., 2010, p. 257.

Рекомендованная литература

Основная литература

- 1. Ettre L. S. (Editor). Nomenclature for Chromatography. IUPAC Recomendations. *Pure & Appl. Chem.*, 1993, v. 65, No. 4, p. 819-872.
- 2. Kazakevich Yu., LoBrutto R. (Editors). HPLC for Pharmaceutical Scientists. Wiley-Interscience, 2007, 1135 p.
- 3. Kromidas S. More Practical Problem Solving in HPLC. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, 306 p.
- 4. Meyer V. R. Practical High-Performance Liquid Chromatography, 5th Edition. John Wiley and Sons, Ltd., 2010, 428 p.
- 5. Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan W. Introduction to modern liquid chromatography, 3rd Edition. *John Wiley & Sons, Inc., 2010, 957 p.*
- 6. **Бёккер Ю.** Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. М., "Техносфера", 2009, 472 с.
- 7. Даванков В. А. (Редактор). Хроматография. Основные понятия. Терминология. Сборники научно-нормативной терминологии. Выпуск 114. М., 1997, 48 с.
- 8. **Кэц Э.** (Редактор). Количественный анализ хроматографическими методами. М., "Мир", 1990, 320 с.
- 9. Рудаков О. Б., Востров И. А., Федоров С. В., Филиппов А. А., Селеменев В. Ф., Приданцев А. А. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. *Воронеж, изд. "Водолей", 2004, 528 с.*
- 10. Садек П. Растворители для ВЭЖХ. М., изд. "БИНОМ. Лаборатория знаний", 2006, 704 с.
- 11.Сакодынский К. И., Бражников В. В., Волков С. А., Зельвенский В. Ю., Ганкина Э. С., Шатц В. Д. Аналитическая хроматография. *М., "Химия", 1993, 464 с.*
- 12.**Стыскин Е. Л., Ициксон Л. Б., Брауде Е. Б.** Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. *М., "Химия".* 1986. 288 с.
- 13. Хенке Х. Жидкостная хроматография. М., "Техносфера", 2009, 264 с.
- 14.**Хеншен А., Хупе К.-П., Лотшпайх Ф., Вёлтер В.** (Редакторы). Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. *М., "Мир", 1988, 688 с.*
- 15.**Хубер Л.** Применение диодно-матричного детектирования в ВЭЖХ. М., "Мир", 1993, 95 с.
- 16.**Шатц В. Д., Сахартова О. В.** Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. *Рига, "Зинатне", 1988, 390 с.*
- 17. Fanali S., Haddad P. R., Poole C. F., Schoenmakers P., Lloyd D. (Editors). Liquid Chromatography: Applications. *Elsevier Inc.*, 2013, 683 pp.

Дополнительная литература

- 1. Ahuja S., Dong M. W. (Editors). Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. Elsevier Inc., 2005, 679 p.
- 2. Bliesner D. M. Validating Chromatographic Methods. A Practical Guide. John Wiley & Sons, Inc., 2006, 297 p.
- 3. Cazes J. (Editor). Encyclopedia of Chromatography, Third Edition. Volums I-III. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010, 2518 p.
- 4. **Cecchi T.** Ion-Pair Chromatography and Related Techniques Analytical Chemistry. *CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010, 218 p.*
- 5. Corradini D., Phillips T. M. (Editors). Handbook of HPLC, 2nd Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011, 713 p.
- 6.Dong M. W. Modern HPLC for practicing scientists. Wiley-Interscience, 2006, 306 p.
- 7.**Gooding K. M., Regnier F. E.** (Editors). HPLC of Biological Macromolecules, 2nd Edition. *Marcel Dekker, Inc., 2002, 792 p.*
- 8. Guillarme D., Veuthey J.-L. (Editors). UHPLC in Life Sciences. The Royal Society of Chemistry, 2012, 447 p.
- 9. Scott R. P. W. Chromatographic Detectors. Design, Function, and Operation. Marcel Dekker, Inc., 1996, 545 p.
- 10.**Smith R. M.** (Editor). Retention and selectivity in liquid chromatography. Prediction, standardisation and phase comparisons. *Elsevier Science B.V.*, 1995, 479 p.
- 11. **Snyder L. R., Dolan W.** High-Performance Gradient Elution. The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model. *Wiley-Interscience*, 2007, 488 p.
- 12. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. G. Practical HPLC Method Development, 2nd Edition. Wiley-Interscience, 1997, 800 p.
- 13. **Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J.** (Editors). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. *CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011, 998 p.*
- 14. Даванков В. А., Навратил Дж., Уолтон Х. Лигандообменная хроматография. М., "Мир", 1990, 294 с.
- 15.**Исии Д.** (Редактор). Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию. *М., "Мир",* 1991. 240 с.
- 16. Киркленд Дж. (Редактор). Современное состояние жидкостной хроматографии. М., "Мир", 1974, 325 с.
- 17. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. М., "Мир", 1989, 399 с.

Задача 1: как величина фактора удерживания вещества зависит от силы элюента?

Обращенно-фазовая хроматография по своему принципу относится к распределительной хроматографии. Это означает, что удерживание вещества на колонке с обращенной фазой определяется константой распределения молекул вещества-аналита между неподвижной и подвижной фазами. В экстракционных двухфазных системах, когда мы имеем дело с двумя несмешивающимися жидкостями, константа распределения численно равна отношению концентраций вещества в обоих растворителях при условии равенства их объемов. Колонку с обращенной фазой в первом приближении тоже можно считать двухфазной системой, в которой один растворитель движется (элюент), а второй, находящийся между алифатическими радикалами, неподвижен. Схематично это показано на рисунке в *Приложении 12*. Мы полагаем, что вода, как компонент элюента, "выталкивает" ацетонитрил из элюента в "щетку" радикалов С18, так как растворение ацетонитрила в воде сопровождается разрушением ее "структуры", обусловленной наличием водородных связей между атомами кислорода и водорода воды. Отметим, что такое объяснение принципа обращеннофазовой хроматографии мы ранее нигде не встречали, но оно нам представляется более наглядным, чем пространные рассуждения о межмолекулярных взаимодействиях молекул аналита с гипотетическим растворителем "С18".

Очевидно, что элюирующая способность водноорганической подвижной фазы будет тем больше, чем выше будет концентрация органического растворителя. Зависимость фактора удерживания вещества от концентрации растворителя **Б** (сила элюента – *solvent strength*) в бинарном элюенте вполне удовлетворительно описывается уравнением (11), о котором упоминается в *Приложении 12*:

$$k = k_W \cdot 10^{-S\phi}$$
 или $\lg k = \lg k_W - S\phi$,

где k – фактор удерживания вещества; k_W – фактор удерживания вещества в воде (0% **Б**); S – константа аналита для бинарного элюента; ϕ – объемная доля растворителя **Б** в элюенте (ϕ = 0,01% **Б**).

Проверка справедливости этого уравнения для аналита является важным этапом разработки методики его определения с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Если оно соблюдается, то подбор оптимальной концентрации **Б** не составит труда, если не соблюдается, то это означает, что наряду с распределительным механизмом удерживания имеется еще, например, адсорбция. В этом случае целесообразно ввести в состав элюента компоненты, подавляющие адсорбцию до минимального уровня.

Методика проверки справедливости уравнения (11) проста. Покажем это на примере двух аналитов (2- и 3-нитроанилины), которые будем хроматографировать на виртуальном хроматографе, меняя только состав элюента.

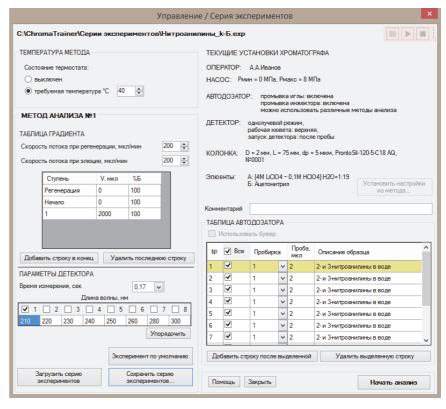
Условия серии экспериментов:

- скорость потока: 200 мкл/мин;
- температура: 40°С;
- детектор: λ = 210 нм, τ = 0,17 с;
- проба: водный раствор 2- и 3-нитроанилинов (концентрации 0,1 и 0,2 мг/мл соответственно);
- объем пробы: 2 мкл.

В таблице Автодозатора 11 строк, что соответствует 11 методам анализа. В каждом методе в таблице Градиента в колонку "%**Б**" вписываем концентрации **Б** от 100 до 0%. На рисунке справа показано заполнение таблицы Градиента для Метода анализа №1, который относится к первой строке таблицы Автодозатора.

Концентрации нитроанилинов в растворе пробы различаются в 2 раза, что позволяет легко идентифицировать на хроматограммах пики каждого вещества — их коэффициенты экстинкции при λ = 210 нм близки, и площадь и высота пика 3-нитроанилина будет примерно в 2 раза больше площади и высоты пика 2-нитроанилина.

Полученные хроматограммы остается загрузить в программу АльфаСпектр и определить объемы и факторы удерживания нитроанилинов. Результаты обработки хроматограмм приведены в таблице.

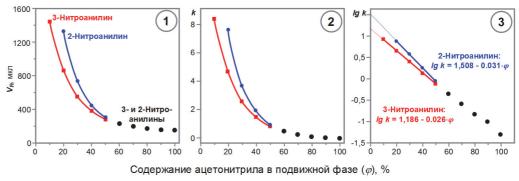


Из графиков зависимостей V_R , k и $\lg k$ от %**Б** видно, что в диапазоне концентраций **Б** от 10 до 40% чувствительность удерживания к изменению состава элюента очень сильная, и это надо учитывать при подборе условий разделения.

Содержание Б в з	элюенте (%):	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	<i>V_R</i> , мкл	>2000	1420	829	532	353	264	217	188	172	165	158
3-Нитроанилин	k	-	8,47	4,53	2,54	1,35	0,76	0,45	0,26	0,15	0,10	0,05
	lg k	-	0,928	0,656	0,405	0,130	-0,119	-0,347	-0,582	-0,824	-1,000	-1,301
	V_R , мкл	>2000	>2000	1298	721	420	285	217	188	172	165	158
2-Нитроанилин	k	-	-	7,65	3,81	1,80	0,90	0,45	0,26	0,15	0,10	0,05
	lg k	-	-	0,884	0,581	0,255	-0,046	-0,347	-0,582	-0,824	-1,000	-1,301
								Пики н	итроани	линов н	е раздел	пились

На рис. 3 зависимости $lg\ k = f(C)$ имеют линейный характер, и мы делаем вывод, что оба нитроанилина хроматографируются по распределительному механизму.

Отметим, что линейность функции $lg\ k=f(C)$ справедлива для бинарного элюента, а в нашем случае элюент содержит



четыре компонента: воду, ацетонитрил, перхлорат лития и хлорную кислоту. Однако, специальные исследования показали, что для большого числа соединений, включая нитроанилины, влияние двух последних компонентов на механизм удерживания нитроанилинов мало¹⁾.

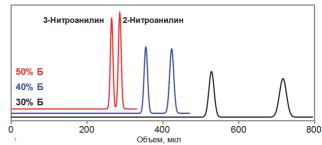
¹⁾ **Азарова И. Н., Барам Г. И.** Применение перхлората лития в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии аминосоединений. *Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14. Вып. 1, сс. 65-74.*

Задача 2: связь фактора разделения (α) с эффективностью колонки (N) и разрешением пиков ($R_{\rm S}$)

Значения хроматографических параметров, перечисленных в теме Задачи, во многом определяют успешность хроматографического анализа и они являются типичными целями оптимизации при разработке любой методики. Рассмотрим один из вариантов такой оптимизации.

В процессе ознакомления с Виртуальным хроматографом мы хроматографировали пробу раствора 2- и 3-нитроанилинов в следующих условиях:

- режим работы хроматографа: серия экспериментов;
- колонка: Ø2 x 75 мм с *ProntoSIL*-120-5-С18 AQ, V₀ = 150 мкл;
- <u>элюенты:</u> **A** 0,2 M LiClO₄ 0,005 M HClO₄, **Б** ацетонитрил;
- скорость потока: 200 мкл/мин;
- температура: 40°С;
- детектор: λ = 210 нм, τ = 0,17 с;
- проба: раствор 2- и 3-нитроанилинов в воде (по 0,1 мг/мл);
- <u>объем пробы:</u> 2 мкл.



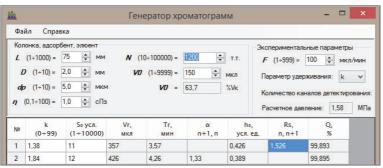
Ниже приведены данные, полученные в результате обработки этих хроматограмм в программе АльфаСпектр:

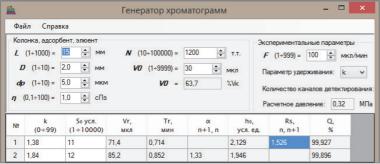
Nº	Состав элюента	Вещества	<i>V_R</i> , мкл	k	α	<i>h</i> ₂₁₀ , е.о.п.	S ₂₁₀ , e.o.п. ⋅ мкл	<i>P</i> , M∏a	<i>N,</i> теор. тар.	Rs
1	50% Б	3-Нитроанилин	266	0,78	1.16	1,25	11	3,1	6000	1,50
	00 / 0 B	2-Нитроанилин	288	0,92	1,10	1,33	12	0,1	0000	1,00
2	40% Б	3-Нитроанилин	357	1,38	1,33	0,92	11	3,4	6000	3,39
	40 /0 D	2-Нитроанилин	426	1,84	1,55	0,89	12	3,4	0000	3,33
3	30% Б	3-Нитроанилин	531	2,54	1,50	0,63	11	3,5	6000	5.86
	30 /0 B	2-Нитроанилин	721	3,80	1,50	0,53	12	3,5		3,00

Как видно из Таблицы, в эксперименте 1 разрешение пиков R_S = 1,50, что вполне достаточно для проведения количественного определения каждого вещества. В экспериментах 2 и 3 разрешение пиков оказалось избыточным и, как следствие, увеличилось время анализа и уменьшилась его чувствительность, так как уменьшилась высота пиков.

Можно ли улучшить результаты, полученные в эксперименте 1? Будем считать этот вопрос условием *Задачи* 2, а для ее решения сформулируем следующие вспомогательные вопросы:

- 1. На сколько нужно укоротить колонку, чтобы при использовании элюентов "40% **Б**" и "30% **Б**" разрешение пиков нитроанилинов составило 1,50?
- 2. Как изменится высота пиков (чувствительность анализа) при переходе на короткие колонки?
- 3. Какое давление будет при хроматографировании на коротких колонках?





Воспользуемся программой "Генератор хроматограмм" и начнем с элюента "40% **Б**". Введем в таблицу значения k нитроанилинов и будем изменять эффективность колонки (N), вычисляя параметры до тех пор, пока не получим $R_S \approx 1,50$. Такое разрешение пиков достигается при N = 1200 теоретических тарелок (см. верхний рисунок).

Затем вычислим длину колонки, исходя из предположения, что при изменении L высота теоретической тарелки (H) не изменяется. Так как для исходной колонки

$$H = L/N = 75000/6000 = 12.5 \text{ MKM}$$

то длина колонки "Х" вычисляется как

$$L_X = 12.5 \cdot N_X = 12.5 \cdot 1200 = 15 \text{ MM}.$$

Рассуждая аналогично, вычислим V_0 колонки "X":

$$V_{0x} = (L_x/75) \cdot 150 = 30$$
 мкл.

Подставим полученные значения L_X и V_{0X} в соответствующие поля в Генераторе хроматограмм и вычислим хроматографические параметры (см. нижний рисунок).

Давление на входе в колонку найдем как $P_X = (L_X/75) \cdot P_{75 \text{ мм}} \text{ (МПа)}.$

Проведем такие же вычисления для элюента "30% Б" и внесем результаты в таблицу:

Nº	Состав элюента	Вещества	k	α	S ₂₁₀ , е.о.п. ⋅ мкл	<i>N,</i> теор. тар.	<i>L</i> ,	V ₀ , мкл	<i>V_R</i> , мкл	<i>h</i> ₂₁₀ , е.о.п.	<i>P</i> , M∏a	Rs
1	50% Б	3-Нитроанилин	0,78	1,18	11	6000	75	150	267	1,27	3,1	1,47
		2-Нитроанилин	0,92		12				288	1,29		
2	40% Б	3-Нитроанилин	1,38	1,33	11	1200	15	30	71	2,13	0,7	1,53
		2-Нитроанилин	1,84		12				85	1,95		
3	30% Б	3-Нитроанилин	2,71	1,46	11	450	5	10	37	2,51	0,2	1,59
		2-Нитроанилин	3,96		12				50	2,05		

Теперь осталось сгенерировать хроматограммы для всех трех колонок и сравнить их с хроматограммами, полученными на виртуальном хроматографе. Сравнение позволяет сделать очевидные, но весьма неожиданные выводы: "Если среди исходных хроматограмм лучшей была хроматограмма № 1 (50% Б), то после уменьшения длины колонки она

Элюент 50% Б – колонка Ø2 x 75 мм (N = 6000 т.т.) Элюент 40% Б – колонка Ø2 x 15 мм (N = 1200 т.т.) Элюент 30% Б – колонка Ø2 x 5 мм (N = 450 т.т.)

3-Нитроанилин
2-Нитроанилин
Объем, мкл стала худшей из трех". Аргументы в пользу применения короткой колонки и элюента "30% **Б**" выглядят убедительно:

- время анализа и расход подвижной фазы сократились почти в 6 раз;
- чувствительность анализа увеличилась в 2 раза;
- давление на входе в колонку снизилось в 15 раз.

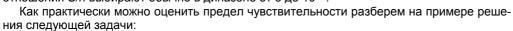
В заключение остается добавить, что практически реализовать методику определения нитроанилинов на колонках \emptyset 2 x 15 и \emptyset 2 x 5 мм можно лишь в том случае, если это позволит конструкция хроматографа. Соединительные капилляры, инжектор и ячейка детектора должны быть такими, чтобы их вклад в уширение пиков был приемлемо малым¹⁾.

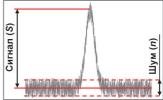
¹⁾ Исии Д. (Редактор). Введение в микро ВЭЖХ. М., изд. "Мир", 1991, с. 14-44.

Задача 3: предел чувствительности хроматографического анализа

О чувствительности хроматографического анализа написаны целые главы в солидных монографиях, и мы не станем их здесь подробно разбирать. Рассмотрим лишь один аспект проблемы, связанный с

шумом детектора, амплитуда которого определяет минимально допустимую высоту пика. Очевидно, что от величины отношения "сигнал/шум" (S/n) будет зависеть погрешность вычисления площади пика, которая, в свою очередь, будет влиять на погрешность определения концентрации аналита в анализируемом растворе. Приемлемое значение отношения S/n выбирают обычно в дипазоне от 3 до 10 ¹⁾

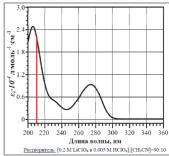




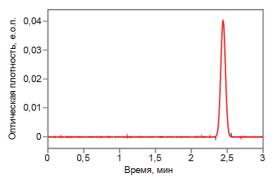
Оценить предел обнаружения кофеина в водном растворе методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детекцией на колонке Ø2 x 75 мм с фазой *ProntoSIL*-120-5-C18 AQ (V₀ = 150 мкл) при условии, что его фактор удерживания k = 2-3, объем пробы равен 5 мкл, а $S/n \ge 3$.

1. Сначала подберем для кофеина состав элюента, в котором его k = 2-3. Для этого приготовим водный раствор с концентрацией 0,1 мг/мл и проведем несколько экспериментов, изменяя в элюенте содержание ацетонитрила. Скорость потока установим 200 мкл/мин, а температуру 40°C. Для детектирования выберем время измерения $0.09\,\mathrm{c}$ и $\lambda = 210\,\mathrm{hm}$, при которой коэффициент экстинкции, как видно из УФ-спектра кофеина, близок к максимальному. В результате находим, что при содержании ацетонитрила в элюенте 15% объем удерживания кофеина составит 488 мкл, а фактор удерживания будет равен 2,26.

2. Далее возьмем навеску кофеина 1 мг, растворим ее в 1000 мл воды и 5 мкл полученного раствора (концентрация 1 мкг/мл) прохроматографируем в элюенте, содержащем 15% ацетонитрила, перешлем хроматограмму в программу АльфаСпектр, найдем высоту пика кофеина и уровень шума детектора (команда "Шумы..." в окне "Метод / Настройка метода"), отменив сначала сглаживающий фильтр. Таким образом мы получаем, что высота пика кофеина составляет 0,04, а амплитуда шума – 0,0001 е.о.п.



¹⁾ Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W. Introduction to modern liquid chromatography, 3rd Edition. John Wiley & Sons, 2010, p. 152-158; 499-516.



Теперь у нас есть вся информация для ответа на вопрос, поставленный в Задаче.

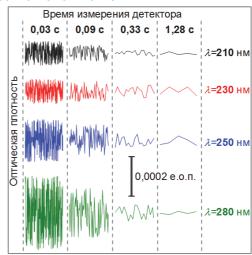
Если высота пика кофеина при C=1 мкг/мл составляет 0,04 е.о.п., то высота, равная 0,0003 е.о.п. (S/n=3), будет соответствовать C=0,0003/0,04=0,0075 мкг/мл.

Можно ли уменьшить этот "предел обнаружения"? Да, сделать это можно. Если иметь ввиду только детектор, то здесь есть три варианта. Например, применение сглаживания шумов с помощью фильтров. Так, фильтрация медианным фильтром по трем точкам уменьшит уровень шума до 0,00003 е.о.п., т.е. в 3 раза. Однако необходимо помнить, что фильтры в той или иной мере искажают хроматограмму, и применять их надо осторожно и с пониманием.

Другой способ уменьшения шума заключается в увеличении времени измерения детектора. Чем выше быстродействие, тем больше шум. На практике время измерения выбирают таким, чтобы число измерений, приходящихся на пик, составляло не более 20-25. В нашем случае, когда время измерения было равно 0,09 с, а ширина пика кофеина равнялась 12 с, на пик пришлось около 120 точек, что, конечно, избыточно. Каким образом уровень шума детектора связан с временем измерения, видно из рисунка: при ускорении детектора в 4 раза шум увеличивается в 2 раза.

Наконец, перейдем к выбору "правильной" длины волны детектора. При разных длинах волн шумы могут заметно отличаться. Это видно на рисунке, где приведены шумы детектора виртуального хроматографа при 4-х длинах волн. Выбирая длину волны детектирования, для которой шум меньше, мы, тем самым, повышаем чувствительность анализа.

Оценку предела чувствительности можно делать и расчетным путем, исходя из спектра вещества, его хроматографических параметров и эффективности колонки. Вся необходимая информация для таких расчетов приведена в *Приложении 10*.



Задача 4: валидация хроматографической методики анализа

Термин "валидация" (англ. – *validation*) в литературе по аналитической химии имеет близкий синоним – "аттестация" и определяется как "процесс, который демонстрирует правильность использования аналитической процедуры"^{1,2)}. Отметим, что "универсальной" валидации быть не может (точно так же, как не бывает "универсальных" методик анализа), но общие подходы сформулированы и систематизированы. Из очевидных соображений ясно, что чем больше составляющих частей аналитической процедуры будет валидировано, тем надежнее будут результаты анализа.

Как валидация осуществляется на практике, покажем на примере валидации методик³⁾. Сначала поясним, как формируется База данных "ВЭЖХ-УФ":

- растворы стандартных образцов различных веществ хроматографируются в одних и тех же условиях на колонке с обращенной фазой при многоволновом УФ-детектировании (длины волн 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм);
- для каждого вещества вычисляются значения объема удерживания (V_R) и площадей пиков при всех длинах волн (S_λ) ;
- ullet значения V_R , S_{210} , S_{220}/S_{210} , S_{230}/S_{210} , S_{240}/S_{210} , S_{250}/S_{210} , S_{260}/S_{210} , S_{260}/S_{210} , S_{200}/S_{210} каждого вещества получают статус "калибровочные" и вводятся в Базу данных.

Когда База данных создана, её можно использовать для определения всех веществ, входящих в Список Базы. Идентификация веществ осуществляется по значениям их V_R и по спектральным отношениям, а концентрация (C) в растворе пробы находится из линейной калибровочной зависимости $C = f(S_{210})$.

Преимущества такой "почти универсальной" методики трудно переоценить. Если обычная методика требует сначала предварительной калибровки хроматографа по раствору стандартного вещества, а лишь потом выполняется сам анализ, то наличие Базы данных делает стадию калибровки лишней, экономя химику и время, и расходуемые материалы. Фактически единственным условием применимости данного подхода является то, что хроматографическая система, на которой формировалась База данных и система, используемая для конкретного анализа, должны быть максимально близки по всем своим характеристикам. Наилучший вариант — тот же хроматограф, те же элюенты, колонка, скорость потока, температура и т. д. В этом случае погрешность анализа будет минимизирована.

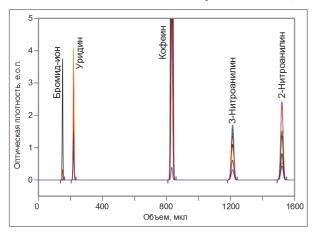
Методика, которую мы будем валидировать, реализована на хроматографе "Милихром A-02" со специальной колонкой $Ø2 \times 75$ мм с фазой *ProntoSIL*-120-5-*C*18 *AQ* [БД-2003] и элюентами: **A** - 0,2 M LiClO₄ − 0,005 M HClO₄; **Б** - ацетонитрил. Именно такой колонкой и такими элюентами "снабжен" виртуальный хроматограф.

¹⁾ Bliesner D. M. Validating Chromatographic Methods, A Practical Guide, John Wiley & Sons, Inc., 2006, p. 1.

²⁾ Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan W. Introduction to modern liquid chromatography, 3rd Edition. John Wiley & Sons, 2010, p. 531-567.

³⁾ **Методики** № ФР.1.31.2003.00950, № ФР.1.31.2003.00951 и № ФР. 1.31.2006.02966. *Раздел Тренажера "Документация"*.

Валидация заключается в хроматографировании пробы раствора пяти веществ: бромид калия (0,2 мг/мл); уридин (0,2 мг/мл); кофеин (1,0 мг/мл); 3-нитроанилин (0,1 мг/мл) и 2-нитроанилин (0,1 мг/мл) — который мы приготовим с помощью Мастера подготовки образца. Условия хроматографирования те же, что и для методики, которая предусматривает использование Базы данных: регенерация колонки — 800 мкл 5% \mathbf{E} ; градиентная элюция — 4000 мкл от 5 до 100% \mathbf{E} и 300 мкл 100% \mathbf{E} ; скорость потока — 100 мкл/мин; температура — 40°C; детектор — 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм и τ = 0,09 с; объем пробы — 4 мкл. Для проведения валидации хроматограф в программе АльфаХром-Т надо установить в режим "Серия анализов", включить термостат на 40°C и в окне "Серия анализов" загрузить метод *А02valid.mtd*. Полученную хроматограмму остается лишь загрузить в программу АльфаСпектр и вызвать на экран или напечатать "Отчет по валидации" из пункта меню "БД ВЭЖХ-УФ".



Компонент		Попомоть	3		начения		
компонент	Пик	Пик Параметр		±δ	Измер.	Нет	
	40	0	40	Да			
		<i>F</i> , мкл/мин	100	0	100	Да	
Бромид-ион	1	V_R , мкл	150	9	151	Да	
Уридин	2	S ₂₈₀ /S ₂₅₀	0,50	0,04	0,50	Да	
Кофеин	3	S ₂₆₀ /S ₂₈₀	0,76	0,05	0,76	Да	
3-Нитроанилин	4	S ₂₆₀ /S ₂₃₀	0,60	0,03	0,60	Да	
2-Нитроанилин	5	V_R , мкл	1525	61	1521	Да	
2-Нитроанилин	5	S ₂₁₀	24,80	1,49	25,02	Да	
2-Нитроанилин	5	A _{10%}	1,04	0,20	0,98	Да	
2-Нитроанилин	5	S ₂₂₀ /S ₂₁₀	1,69	0,05	1,68	Да	
2-Нитроанилин	5	S ₂₃₀ /S ₂₁₀	1,74	0,12	1,77	Да	
2-Нитроанилин	5	S ₂₄₀ /S ₂₁₀	1,07	0,10	1,11	Да	
2-Нитроанилин	5	S ₂₅₀ /S ₂₁₀	0,57	0,05	0,58	Да	
2-Нитроанилин	5	S ₂₆₀ /S ₂₁₀	0,39	0,03	0,40	Да	
2-Нитроанилин	5	S ₂₈₀ /S ₂₁₀	0,59	0,03	0,60	Да	
2-Нитроанилин	5	S ₃₀₀ /S ₂₁₀	0,31	0,03	0,32	Да	

Как следует из Отчета, все параметры хроматографической системы "в норме" и хроматограф готов для работы по методике с Базой данных "ВЭЖХ-УФ". Периодичность валидации химик-аналитик определяет самостоятельно. исходя из своего опыта и степени ответственности за результат анализа.

Необходимо отметить, что описанная процедура не только констатирует пригодность или непригодность системы для работы по методикам с Базой данных, но и позволяет осуществить диагностику состояния практически всех составляющих системы. В таблице показано, какие основные показатели контролируют измеряемые параметры¹⁾. Другими словами, в процессе валидации осуществляется комплексная поверка хроматографической системы, которая обычно требует многих часов. Правильные значения измеряемых параметров приведены в "Отчете по валидации" в колонке "Значения точно". Справа от этих значений указаны погрешности, величина которых характерна для всего семейства хроматографов "Милихром А-02", что было установлено при метрологической аттестации методики База данных "ВЭЖХ-УФ".

В настоящее время База данных содержит калибровочные параметры для 500 веществ (см. список в разделе "Документация: Списки веществ Базы данных") и любой пользователь может наполнять её самостоятельно (см. Задачу 6). Аттестованные хроматографические колонки, элюент А и поверочный раствор поставляет ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", где и производятся хроматографы "Милихром А-02".

Вещество	Измеряемый параметр	Контролируемый показатель			
Бромид-ион	VR	Мертвый объем колонки			
Уридин	S ₂₈₀ /S ₂₅₀	Погрешность длины волны детектора вблизи 250 и 280 нм			
Кофеин	S ₂₆₀ /S ₂₈₀	Линейность детектора			
3-Нитроанилин	S ₂₆₀ /S ₂₃₀	Погрешность значения рН элюента А			
	V _R	Погрешность скорости потока			
	S ₂₁₀	Погрешность объема пробы			
	A _{10%}	Качество смешивания элюентов А и Б . Качество упаковки колонки			
	S ₂₂₀ /S ₂₁₀				
2-Нитроанилин	S ₂₃₀ /S ₂₁₀				
	S ₂₄₀ /S ₂₁₀	Derneuweger, grann i persui i recontrene e			
	S ₂₅₀ /S ₂₁₀	Погрешность длины волны детектора в дипазоне 210-300 нм			
	S ₂₆₀ /S ₂₁₀				
	S ₂₈₀ /S ₂₁₀				
	S ₃₀₀ /S ₂₁₀				

¹⁾ Рутенберг О. Л., Фаткудинова Ш. Р., Барам Г. И., Азарова И. Н. О метрологическом обеспечении баз данных для идентификации и количественного определения УФ-поглощающих веществ методом ВЭЖХ. Заводская лаборатория. Диагностика материалов, 2006, Том 72. № 6. с. 59-66.

Задача 5: определение концентрации кофеина в чае

Чай является весьма сложным объектом для хроматографического анализа, так как в нем содержится более 300 веществ, разделить которые между собой не так просто¹⁾. Мы ограничимся в этой задаче определением лишь одного, но самого известного его компонента – кофеина. Содержание кофеина в чае зависит от его происхождения и в среднем составляет 3%.

Сформулируем аналитическую задачу следующим образом:

Определить количество кофеина, которое мы получаем, выпивая обычную чашку чая (200 мл).

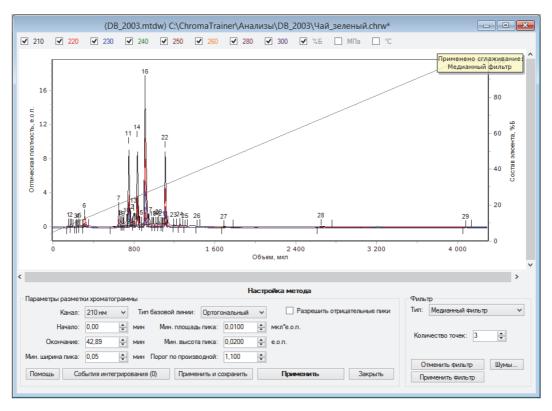
На виртуальном хроматографе нельзя эмулировать хроматограммы растворов смеси неизвестных веществ, поэтому мы обратимся к реальной хроматограмме, полученной на хроматографе "Милихром А-02" по методике, предполагающей применение Базы данных "ВЭЖХ-УФ" для идентификации пиков веществ и определения их концентрации²⁾. Условия анализа были следующими:

- колонка: Ø2 x 75 мм с фазой ProntoSIL-120-5 C18 AQ БД-2003;
- <u>элюенты:</u> **A** 0,2 M LiClO4 0,005 M HClO4; **Б** ацетонитрил;
- режим элюирования: регенерация колонки 800 мкл 5% **Б**; линейный градиент 4000 мкл от 5 до 100% **Б**, 300 мкл 100% **Б**;
- скорость потока: 100 мкл/мин;
- температура: 40°С;
- детектор: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм; τ = 0,09 с;
- проба: 4 мкл настойки чая;
- <u>подготовка пробы:</u> пакет, содержащий 2 г зеленого китайского чая "Принцесса Ява", выдерживали 5 мин в 200 мл горячей воды (85-95°C), 1 мл центрифугировали при 10000 *g* и 50 мкл надосадочной жидкости отбирали для анализа.

Начнем решать задачу с того, что откроем в программе АльфаХром-Т заранее полученную хроматограмму чая <...\ChromaTrainer\Aнализы\DB_2003\Чай_зеленый.chrx> и загрузим ее в программу АльфаСпектр для математической обработки. В соответствие с начальными настройками уже существующего метода обработки <DB_2003.mtdw> пики на хроматограмме разметятся автоматически, как показано на рисунке.

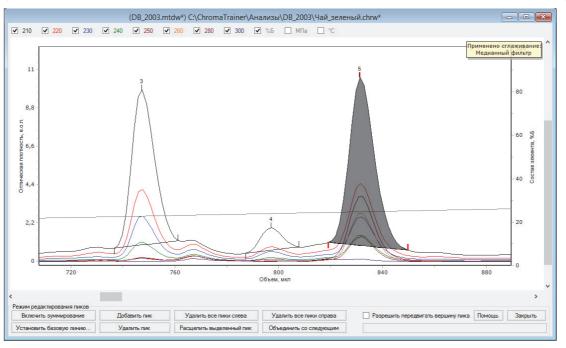
¹⁾ Spiller G. A. (Editor). Caffeine. CRC Press LLC, 1998, 367 p.

²⁾ **Методики** № ФР.1.31.2003.00950 и № ФР. 1.31.2006.02966. *Раздел Тренажера "Документация"*.



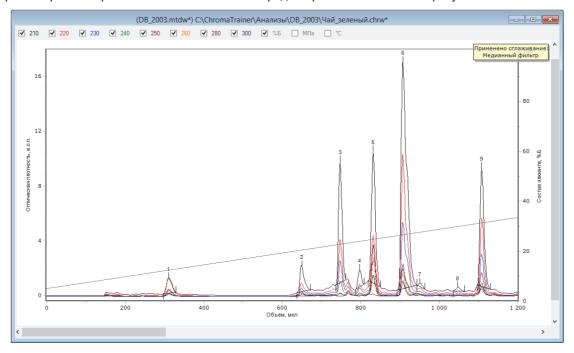
Чтобы изменить разметку на более "грубую", откроем панель "Настройка метода", установим минимальную высоту пика "0,2 е.о.п." и тип базовой линии "Долина к долине". Применим эти изменения и закроем панель.

Следующий этап – корректировка разметки пиков (если она требуется) с помощью "Редактора пиков". Открыв панель Редактора, установим курсор на пик, метки которого мы хотим сдвинуть, и, щелкнув левой клавишей мыши, выделим его. Метки границы пика станут красными и их можно будет сдвигать, наведя на метку курсор и зажав правую клавишу мыши. Для получения более детальной картины можно включить зуммирование и увеличить масштаб на выбранном участке. Увеличенный фрагмент хроматограммы с "исправленными" метками пиков показан на рисунке:

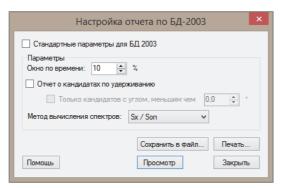


После закрытия Редактора пиков на вопрос "Применить сделанные изменения?" ответим "Да".

Часть хроматограммы с размеченными пиками после редактирования показана на рисунке:



Осталось выполнить последний этап: идентифицировать пики веществ на хроматограмме, если они присутствуют в Базе данных "ВЭЖХ-УФ", и определить концентрацию этих веществ в исследуемой пробе.



Выполним команду "БД ВЭЖХ-УФ/Отчет по базе данных ВЭЖХ-УФ..." и в открывшемся окне "Настройка отчета по БД-2003" установим параметры обработки хроматограммы (см. рисунок), щелкнем по полю "Просмотр". Содержание части Отчета приведено на нижнем рисунке.

На хроматограмме идентифицировался только пик № 5, который по объему удерживания (V_R), по "разностному спектральному углу" (θ) и по спектральным отношениям S_x/S_{210} в пределах аттестованных погрешностей соответствует кофеину. Гомогенность (чистота) пика оценена в 98,3%, а концентрация кофеина в растворе (в чае) составила 0,24 мг/мл. Умножив эту величину на объем чашки (200 мл) мы получаем ответ Задачи:

В чашке зеленого чая содержится 48 мг кофеина.

Параметры распознавания по спектрам

Доверительное окно объема удерживания: 10% Метод вычисления спектров: Sx / Son Число эталонных спектров в базе: 500

Номер пика: 5

Оценка гомогенности: 98,4% Объем удерживания (Vr): 831 мкл Время удерживания: 8,31 мин

Идентификация положительная: Кофеин

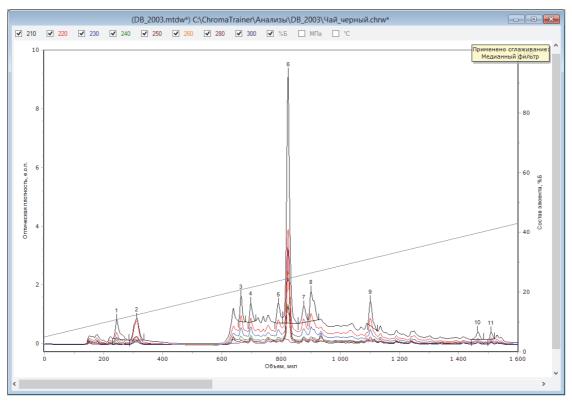
Концентрация 0,243±10% мг/мл

Параметры идентификации:

Название	Vr,	Угол,		Спектральные отношения Sx/S210					
Пазвание	мкл	۰	220	230	240	250	260	280	300
Пик 5	831	-	0,41	0,23	0,14	0,14	0,28	0,37	0,00
Кофеин	846	0,8	0,42	0,23	0,14	0,14	0,27	0,37	0,01

Для сравнения таким же способом найдем концентрацию кофеина в чашке черного чая *Lipton Yellow Label Теа*, приготовленного для анализа также, как и предыдущий образец.

Откроем хроматограмму <...\ChromaTrainer\Анализы\DB_2003\Чай_черный.chrx> в программе АльфаХром-Т, загрузим ее в программу АльфаСпектр, разметим пики, скорректируем разметку с помощью Редактора пиков и выведем на экран "Отчет по Базе данных БД-2003". Размеченная хроматограмма и результаты анализа — часть "Отчета по БД-2003" — показаны ниже.



Хроматограмма водного экстракта черного чая.

Параметры распознавания по спектрам

Доверительное окно объема удерживания: 10%

Метод вычисления спектров: *\$x / \$on*Число эталонных спектров в базе: *500*

Номер пика: 2

Оценка гомогенности: 58,4,8% Объем удерживания (Vr): 313 мкл Время удерживания: 3,13 мин

Идентификация положительная: Галловая кислота

Концентрация $0.031 \pm 10\%$ мг/мл

Параметры идентификации:

Название	Vr,	Угол,		Спект	ральны	е отнош	ения S	(/S210	
Пазвание	мкл	0	220	230	240	250	260	280	300
Пик 5	313	-	0,97	0,32	0,10	0,16	0,30	0,37	0,17
Галловая кислота	319	2,0	1,02	0,30	0,10	0,17	0,32	0,36	0,16

Номер пика: 6

Оценка гомогенности: 94,8% Объем удерживания (Vr): 824 мкл Время удерживания: 8,24 мин

Идентификация положительная: Кофеин

Концентрация $0,207 \pm 10\%$ мг/мл

Параметры идентификации:

Название	Vr,	Угол,		Спект	ральны	е отноц	ения S	c/S210	
Пазвание	мкл	۰	220	230	240	250	260	280	300
Пик 5	824	-	0,40	0,23	0,14	0,14	0,28	0,37	0,01
Кофеин	846	0,8	0,42	0,23	0,14	0,14	0,27	0,37	0,01

Как следует из Отчета, в экстракте черного чая кроме кофеина найдена галловая кислота:

Это соединение образуется в результате ферментативного гидролиза таннина чая и является природным антиоксидантом.

Содержание кофеина в экстракте черного чая оказалось несколько меньшим, чем в экстракте зеленого. Для более корректного сравнения нужны дополнительные исследования, и погрешность определения концентрации необходимо снизить. Согласно методике, основанной на применении Базы данных "ВЭЖХ-УФ", погрешность определения концентрации составляет ±10%. Эта величина получена в результате межлабораторных испытаний методики, и она справедлива для всех хроматографов, прошедших процедуру валидации (см. Задачу 4).

Погрешность анализа можно уменьшить, если откалибровать конкретный хроматограф по стандартным растворам интересующего вещества. Процедура калибровки описана в разделе "Определение концентрации веществ в анализируемых растворах". Очевидно, что хроматограммы исследуемых растворов должны быть получены на том же хроматографе, на котором производилась градуировка.

Задача 6: ввод вещества в Базу данных "ВЭЖХ-УФ"

Мы не раз говорили о преимуществах использования в жидкостной хроматографии Баз данных "ВЭЖХ-УФ" и, в частности, о Базе данных, входящей в состав хроматографа "Милихром А-02" и его виртуального аналога. В настоящее время она содержит в себе данные о 500 веществах, но что делать, если нужного соединения в списке нет? В таком случае надо решить задачу:

Как самостоятельно ввести новое вещество в Базу данных "ВЭЖХ-УФ"?

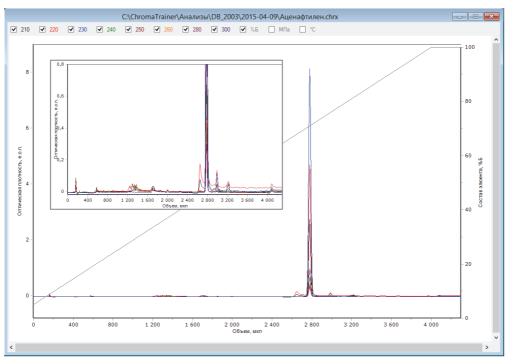
Покажем, как это делается по методике ФР. 1.31.2003.00951, текст которой есть в разделе Тренажера "Документация". Очевидно, что сделать это можно было только на реальном хроматографе, хроматографируя пробу раствора реального вещества. Перед тем, как была получена "калибровочная" хроматограмма, хроматографическую систему валидировали (см. Задачу 4).

В качестве целевого соединения был выбран Аценафтилен, который относится к группе полициклических ароматических веществ и имеет структурную формулу:

В соответствии с методикой условия хроматографии были следующие:

- метод анализа: DB_2003.mtd;
- колонка: Ø2 x 75 мм с фазой *ProntoSIL*-120-5 C18 AQ БД-2003;
- <u>элюенты:</u> **A** 0,2 M LiClO4 0,005 M HClO4; **Б** ацетонитрил;
- <u>режим элюирования:</u> регенерация колонки 800 мкл 5% **Б**; линейный градиент 4000 мкл от 5 до 100% **Б**, 300 мкл 100% **Б**;
- скорость потока: 100 мкл/мин;
- <u>температура:</u> 40°С;
- детектор: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм; τ = 0,09 с;
- <u>проба:</u> 4 мкл раствора аценафтилена в метаноле с концентрацией 0,2 мг/мл (аналитический стандарт Supelco, США).

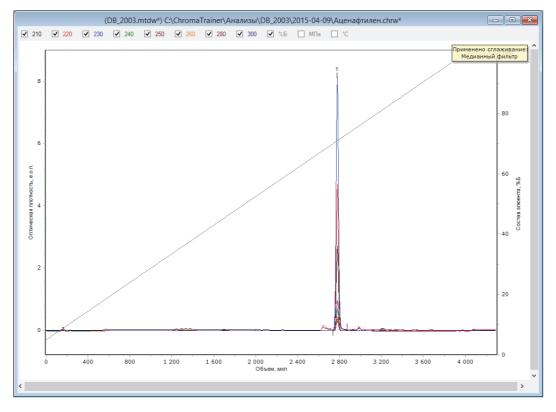
Файл хроматограммы Аценафтилен. chrx помещен в папку <...\ChromaTrainer\Aнализы\DB_2003>. Откроем его в программе АльфаХром-Т. Полученная хроматограмма и ее увеличенный фрагмент приведены на рисунке.



В сертификате, прилагаемому к Стандарту, утверждается, что чистота вещества составляет 98-99%. Будем считать, что так оно и есть, а сумма веществ, пики которых видны при увеличении масштаба в 10 раз, не превышает 1-2%.

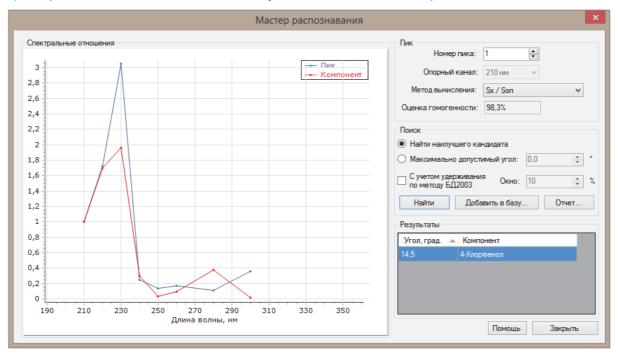
Загрузим хроматограмму в программу АльфаСпектр. Так как метод обработки *DB_2003.mtdw* уже есть, пики на хроматограмме распознаются автоматически. Чтобы оставить только один целевой пик, в панели "Метод/Настройка метода" изменим "Минимальную высоту пика" на 0,2 е.о.п.

Задача 6



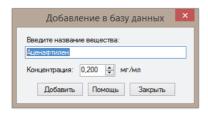
Хроматограмма аценафтилена после обработки по методу *DB*_2003.*mtdw*.

Далее надо открыть окно "Мастер распознавания". В правой части находится нормированный спектр аценафтилена (пик №1), построенный по восьми точкам, соответствующим длинам волн детектора.



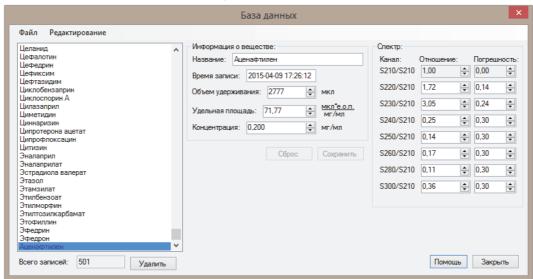
Так как аценафтилена в Базе данных еще нет, по команде "Найти наилучшего кандидата" в поле "Результаты" появится компонент "4-Хлорфенол", имеющий наиболее похожий спектр.

Щелкнув по полю "Добавить в базу...", открываем окно "Добавление в базу данных". Остается ввести название вещества, его концентрацию в стандартном растворе и выполнить команду "Добавить".



Полный состав Базы данных приведен в окне "Формирование базы данных". Вновь введенные вещества располагаются в самом конце списка. В окне "Редактирование/Режим редактирования" можно редактировать информацию и удалять вещества из Базы. Данные о 500 исходных веществах не редактируются.

Возможность ввода новых веществ в Базу данных позволяет самостоятельно составлять разнообразные задачи, предполагающие поиск различных веществ на заранее записанных хроматограммах простых и сложных образцов, начиная от лекарственных средств и кончая хроматограммами сыворотки крови. Примером такой задачи может служить Задача 5.



Условные обозначения и сокращения

A_{λ}	– оптическая плотность при длине волны детектора λ
D	– диаметр колонки
d_p	– размер частиц адсорбента
F	– объемная скорость потока
h	– высота хроматографического пика
Н	– высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)
HPLC	 High Performance (Pressure) Liquid Chromatography
k	– фактор удерживания вещества
L	– длина хроматографической колонки
N	– эффективность колонки, измеряемая числом теоретических тарелок
P	– давление
Q	– чистота (гомогенность) хроматографического пика, %
R	– спектральное отношение $A_{\lambda1}/A_{\lambda2}$ или $S_{\lambda1}/S_{\lambda2}$
Rs	– разрешение двух пиков на хроматограмме
S_{λ}	– площадь хроматографического пика при длине волны детектора λ
t	– время
T	– температура
t_R	– время удерживания вещества
UHPLC	 Ultra Hight Performance (Pressure) Liquid Chromatography

Условные обозначения и сокращения (продолжение)

V	– объем
V ₀	– мертвый объем колонки
V_R	– объем удерживания вещества
W	– ширина основания хроматографического пика
W	– ширина хроматографического пика на половине его высоты
τ	– время измерения детектора
η	– вязкость жидкости
λ	– длина волны света
φ	– объемная доля органического растворителя в воде в бинарной подвижной фазе
θ	– угол между "спектральными" векторами сравниваемых веществ при работе с Базой данных "ВЭЖХ-УФ"
α	– фактор разделения, селективность колонки
\mathcal{E}_{λ}	– экстинкция раствора при длине волны λ
Α	– элюент состава "0,2 M LiClO ₄ – 0,005 M HClO ₄ "
Б	– элюент "ацетонитрил"
вэжх	– высокоэффективная жидкостная хроматография
е.о.п.	– условная <mark>е</mark> диница <mark>о</mark> птической плотности раствора
С	 концентрация вещества в растворе
СВЭЖХ	− сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография
УФ	 ультрафиолетовая область электромагнитного спектра

Барам Григорий Иосифович Барам Евгений Григорьевич

Практикум по ВЭЖХ на виртуальном хроматографе

Компьютерная верстка – Г. И. Барам Дизайн – Г. И. Барам

Формат 60х90 ¹/₁₆. Печать цифровая Усл. печ. л. 5,4. Тираж 100 экз. Зак. №1606 Бумага ColorCopy, плотность 90 г/м²

Отпечатано в ООО «Академ-принт» 630090, г. Новосибирск, ул. Инженерная, 20

