

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ  
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
Факультет естественных наук  
Кафедра аналитической химии**

Дипломная работа

**РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ РАБОТЫ  
И МЕТОДИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ КОМПЬЮТЕРНОГО  
ТРЕНАЖЁРА  
"ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ"**

Петков Андрей Петрович

Научный руководитель  
к.х.н. Азарова Ирина Николаевна

---

Новосибирск – 2008

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ</b> .....	- 4 -
<b>1. ВВЕДЕНИЕ</b> .....	- 6 -
<b>2. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ</b> .....	- 7 -
<b>3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	- 9 -
3.1 Характеристика метода ВЭЖХ.....	- 9 -
3.2 Детектирование в ВЭЖХ .....	- 10 -
3.2.1 Детектирование веществ по поглощению в УФ области спектра.....	- 10 -
3.3 Построение теоретических хроматограмм .....	- 10 -
3.4 Расчёт объёмов удерживания веществ в ВЭЖХ.....	- 11 -
3.4.1 Расчёт объёмов удерживания на основе молекулярного строения вещества .....	- 11 -
3.4.2 Расчёт объёмов удерживания на основе эмпирических соотношений.....	- 13 -
3.5 Расчёт параметров хроматографического пика .....	- 16 -
3.5.1 Форма хроматографического пика .....	- 16 -
3.5.2 Ширина хроматографического пика .....	- 16 -
3.5.3 Связь площади пика с концентрацией вещества в образце .....	- 17 -
3.6 Заключение .....	- 18 -
<b>4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	- 19 -
4.1 Оборудование .....	- 19 -
4.2 Материалы .....	- 19 -
4.3 Методы.....	- 20 -
4.3.1 Приготовление растворов .....	- 20 -
4.3.2 Контроль правильности работы хроматографической системы .....	- 20 -
4.3.3 Определение свободного объёма хроматографической колонки весовым методом .....	- 20 -
4.3.4 Определение объёма задержки градиента .....	- 20 -
4.3.5 Хроматографические методы .....	- 21 -
4.3.6 Измерение характеристик детектора .....	- 21 -
4.3.7 Запись УФ спектров веществ.....	- 22 -
4.3.8 Исследование зависимости давления в системе от скорости потока элюента, состава подвижной фазы и температуры колонки.....	- 22 -
4.3.9 Оценка вклада клапана противодавления в общее давление в системе .....	- 22 -
4.3.10 Исследование эффекта сжатия элюента .....	- 22 -
4.3.11 Оценка влияния качества смешивания элюентов на эффективность хроматографической системы .....	- 23 -
<b>5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	- 24 -
5.1 Введение .....	- 24 -
5.2 Моделирование хроматограмм для градиентного режима элюирования при многоволновом детектировании .....	- 24 -
5.2.1 Измерение свободного объёма колонки .....	- 24 -
5.2.2 Определение объёма задержки градиента .....	- 25 -
5.2.3 Изучение зависимости коэффициентов ёмкости веществ от состава подвижной фазы .....	- 26 -
5.2.4 Расчёт объёмов удерживания веществ при градиентном элюировании .....	- 26 -
5.2.5 Влияние температуры колонки на хроматографическое удерживание.....	- 28 -
5.2.6 Моделирование формы хроматографических пиков.....	- 29 -
5.2.7 Вычисление спектральных характеристик веществ .....	- 30 -
5.2.8 Графическое представление хроматограмм, генерированных для градиентного режима элюирования при многоволновом детектировании.....	- 31 -
5.3 Подход к моделированию метрологических характеристик детектора .....	- 31 -

5.3.1 Оценка уровня шума.....	- 1 -
5.3.2 Оценка дрейфа нулевой линии .....	- 33 -
5.3.3 Исследование диапазона стабильности спектральных отношений .....	- 34 -
5.4 Расчёт давления в гидравлической системе хроматографа .....	- 35 -
5.4.1 Исследование зависимости давления от скорости потока элюента, состава подвижной фазы и температуры колонки.....	- 35 -
5.4.2 Оценка вклада клапана противодействия в общее давление в системе .....	- 35 -
5.4.3 Исследование эффекта сжатия элюента .....	- 36 -
5.5 Алгоритм компьютерного моделирования хроматограмм .....	- 37 -
5.6 Компьютерный тренажёр "Жидкостный хроматограф" .....	- 38 -
5.6.1 Моделирование типичных неисправностей хроматографа .....	- 38 -
5.6.2 Обучение работе на жидкостном хроматографе "Альфахром" с помощью компьютерного тренажёра.....	- 39 -
<b>6. ВЫВОДЫ.....</b>	<b>- 40 -</b>
<b>7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>- 41 -</b>

## УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

$\frac{A_{\lambda 1}}{A_{\lambda 2}}, \frac{S_{\lambda 1}}{S_{\lambda 2}}$  - спектральное отношение

$A_{\lambda}$  - оптическое поглощение раствора вещества при длине волны  $\lambda$

$A, B$  - коэффициенты в уравнении, описывающем форму градиента концентрации органического растворителя в подвижной фазе

$A_{шум}$  - уровень шума детектора (СКО), е.о.п.

$c$  - объёмная доля органического растворителя в подвижной фазе, %

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

$c_s$  - концентрация вещества в пробе, мг/мл

$c_0$  - концентрация органического растворителя в подвижной фазе в начале градиента, %

$c_k$  - концентрация органического растворителя в подвижной фазе в конце градиента, %

$F$  - объёмная скорость потока элюента, мкл/мин

$h$  - высота хроматографического пика, е.о.п.

$k'$  - коэффициент ёмкости вещества

$k'_0$  - коэффициент ёмкости, экстраполированный к нулевому содержанию органического растворителя в подвижной фазе

$k'_1$  - коэффициент ёмкости вещества на изократическом шаге элюирования

$l$  - длина оптического пути, см

$M_{вод}$  - масса хроматографической колонки, заполненной водой, г

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

$N$  - эффективность хроматографической колонки, т.т.

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

$S$  - площадь хроматографического пика, е.о.п.·мкл

$S_0$  - площадь пика при концентрации вещества в пробе 1 мг/мл и объёме введённой пробы 1 мкл, е.о.п.·мл/мг

$v$  - объём малых условных порций элюента, мкл

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

$V_0$  - свободный объём хроматографической колонки, мкл

$V_1$  - объём элюата на изократическом шаге элюирования, мкл

$V$  - текущий объём элюата, мкл

$V_R$  - объём удерживания вещества, мкл

$V'_R$  - объём удерживания вещества, уменьшенный на величину  $V_0$  (приведённый объём удерживания), мкл

$V_S$  - объём пробы, мкл

$V_y$  - объём элюата в конце градиента, мкл

$V_z$  - объём задержки градиента, мкл

$\Delta V_{сжатия}$  – изменение объёма подвижной фазы при сжатии, мкл  
 $Q_S$  - масса вещества в пробе, мкг  
 $w_{1/2}$  – ширина хроматографического пика на половине высоты, мкл  
 $\varepsilon_\lambda$  - молярный коэффициент экстинкции раствора вещества  
при длине волны  $\lambda$ , л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>  
 $\rho$  – плотность вещества, г/см<sup>3</sup>  
 $\sigma$  - дисперсия хроматографического пика, мкл  
 $\tau$  - постоянная времени детектора, с  
 $\chi$  - параметр, задающий форму градиента

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – один из основных методов аналитической химии. ВЭЖХ востребована во многих областях промышленности, науки, медицины и т.д. Однако, несмотря на широкие возможности ВЭЖХ и более чем тридцатипятилетнюю историю, этот метод ещё не находит должного применения. Одной из причин тому являются проблемы, связанные с подготовкой специалистов в этой области химического анализа. Освоение данного метода требует большого набора практических навыков, для чего необходимо обеспечить учебные лаборатории дорогостоящим хроматографическим оборудованием. Для многих учебных заведений это труднодоступно. Как следствие, кафедры аналитической химии университетов не могут обеспечить хроматографами учебный процесс, и студенты получают в основном лишь теоретические знания. Это влечёт за собой низкий уровень подготовки специалистов и таким образом сдерживает развитие метода ВЭЖХ.

Решение данной проблемы нам видится в широком применении в учебном процессе компьютерных тренажёров, которые бы максимально полно имитировали реальный жидкостный хроматограф.

Таких тренажёров в настоящее время не существует, и их разработка представляется важной задачей.

## 2. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

В целях повышения эффективности обучения тренажёр "Жидкостный хроматограф" должен быть разработан на основе реального "универсального" хроматографа. Таким прототипом мы выбрали хроматограф "Альфахром", который представляет собой новую модификацию известного хроматографа "Милюхром А-02", производится ЗАО "ЭкоНова" (г. Новосибирск) и в течение нескольких лет используется в учебном процессе на кафедре аналитической химии НГУ. Безусловно, подобный тренажёр может быть разработан на базе любого жидкостного хроматографа.

Поскольку тренажёр должен максимально полно имитировать возможности хроматографа-прототипа, то следует учитывать все его технические и метрологические особенности. Ниже мы приводим их краткое описание.

Хроматограф "Альфахром" состоит из двухшприцевого градиентного насоса объёмом 5 мл с возможностью подачи элюента в диапазоне объёмных скоростей от 5 до 1000 мкл/мин; автоматического дозатора на 46 проб; термостатируемой колонки  $\varnothing 2 \times 75$  мм с установкой температуры от 35 до 90 (воспроизводимость установки  $\pm 0,1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ; спектрофотометрического детектора с возможностью многоволновой регистрации (до 8 длин волн одновременно) в диапазоне 190 - 360 нм и электронного блока. Максимально допустимое давление в гидравлической системе 7,1 МПа. Схема "Альфахрома" показана на рис. 1.

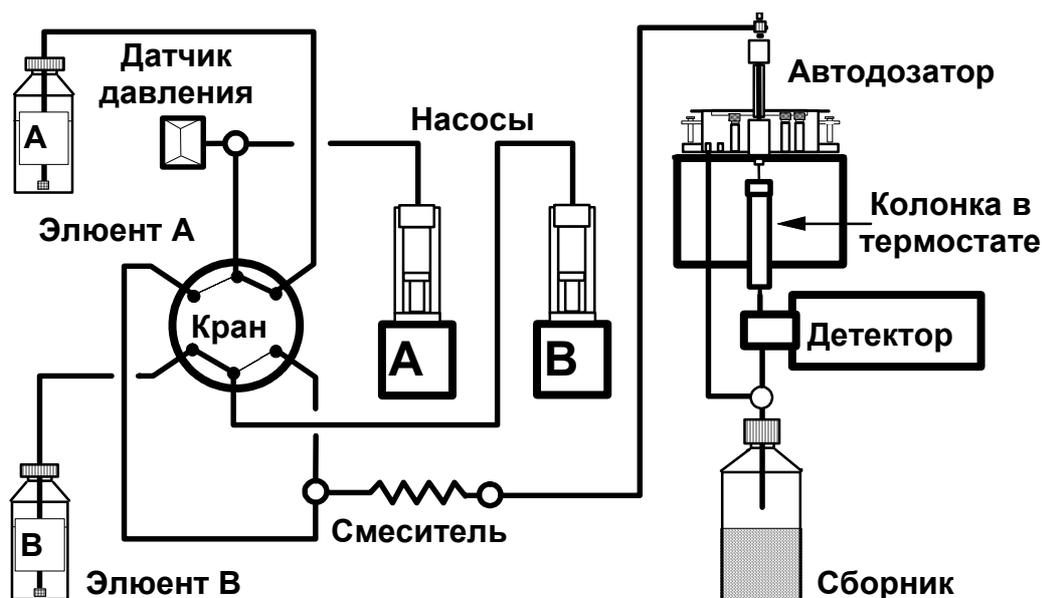


Рис. 1. Схема хроматографа "Альфахром"

Хроматограф управляется компьютером с помощью программы "Альфахром" (ЗАО "ЭкоНова", г Новосибирск); хроматограммы обрабатываются с помощью программы "МультиХром-СПЕКТР" (ЗАО "Амперсенд", Москва).

Тренажёр должен обеспечивать возможность имитации всех основных функций прибора в соответствии с их спецификацией:

- управление хроматографом в ручном режиме (подготовка хроматографа к работе);
- проведение анализа в автоматическом режиме;
- запись УФ спектра в диапазоне 190 - 360 нм;
- обработка хроматограмм.

Для реализации поставленной задачи требуется проведение следующих работ:

- моделирование работы всех узлов хроматографа "Альфахром" в штатном и нештатном режимах;
- разработка модели расчёта хроматографических и спектральных параметров веществ и графического представления многоволновых хроматограмм для любых условий проведения анализа;
- экспериментальное получение хроматографических и спектральных параметров веществ, необходимых для построения многоволновых хроматограмм (создание базы данных).
- написание на основе полученных данных компьютерной программы-тренажёра "Жидкостный хроматограф", включающей в себя все алгоритмы расчётов и необходимые анимации;
- разработка типовых задач для тренажёра "Жидкостный хроматограф".

Алгоритм работы тренажёра в виде блок-схемы представлен на рис. 2.

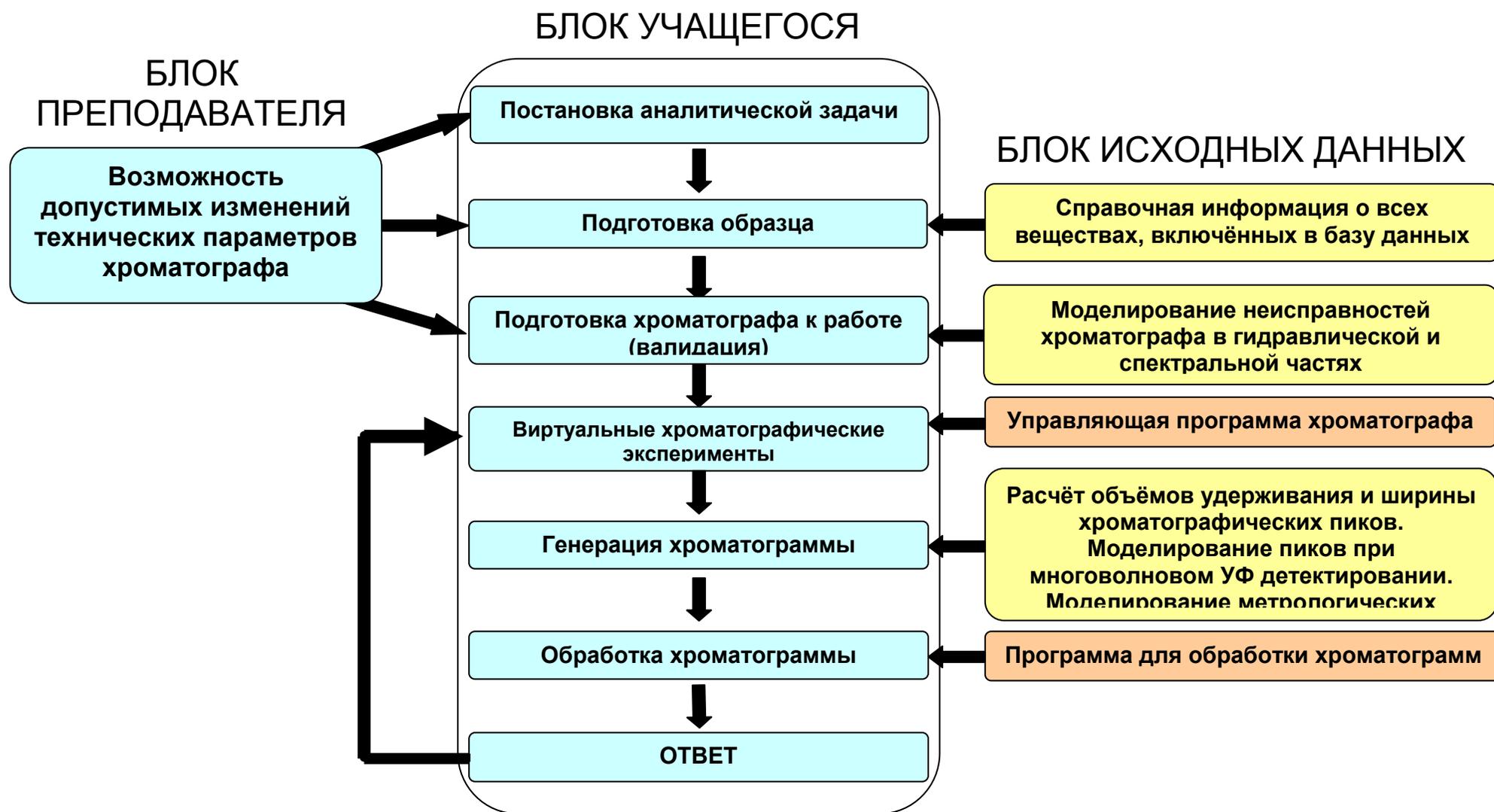


Рис. 2. Блок-схема компьютерного тренажёра "Жидкостный хроматограф".

### 3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 3.1 Характеристика метода ВЭЖХ

Метод ВЭЖХ занимает важное место в современной аналитической химии. Он находит применение во многих областях человеческой деятельности: в науке - для решения аналитических и препаративных задач; в промышленности - для контроля качества продукции (фармацевтическое, пищевое, ликероводочное, нефтеперерабатывающее и другие производства); в государственных структурах – криминалистические и судебно-медицинские лаборатории, агрохимическая и природоохранная службы, лаборатории Роспотребнадзора, Росздравнадзора и т.д.

Метод ВЭЖХ основан на разделении веществ за счёт их различного физического и химического взаимодействия с хроматографической системой (неподвижная фаза и элюент) [1]. Основной неподвижной фазой в ВЭЖХ является силикагель. Он применяется и как таковой, и как носитель химически привитых фаз. Использование химически привитых неподвижных фаз расширяет возможности ВЭЖХ, делая её пригодной для разделения водорастворимых соединений. В настоящее время около 90% всех анализов методом ВЭЖХ выполняют на химически привитых фазах, главным образом фазах с привитыми алкильными группами (обращенных фазах, далее ОФ) [1]. В этом случае неподвижная фаза неполярна, а подвижная - полярна.

ОФ могут отличаться друг от друга характеристиками матрицы - силикагеля - и строением привитого радикала. К основным характеристикам силикагеля относятся: размер зерна (обычно от 3 до 10 мкм), форма зерна (сферическая или неправильная), размер пор зерна (от 5 до 50 нм), удельная поверхность (от 10 до 600 м<sup>2</sup>/г). Наибольшее распространение получила обращённая фаза C<sub>18</sub>. Её используют для разделения как неполярных (например, ароматических углеводов), так и водорастворимых соединений [1].

В ОФ ВЭЖХ разделение смеси веществ происходит в результате различия в коэффициентах распределения веществ между подвижной и неподвижной фазами [2] по распределительному механизму. Причиной сорбции в ОФ ВЭЖХ служит притяжение полярных молекул элюента друг к другу, "прижимающее" растворённые молекулы веществ-аналитов к неполярной поверхности сорбента. Поэтому выбор элюента, как правило, в более значительной степени влияет на разделение, чем выбор неподвижной фазы, и элюирующая сила растворителей возрастает с уменьшением их полярности [3]. Элюотропный ряд, в котором растворители располагаются в порядке возрастания их элюирующей силы, выглядит следующим образом: вода - метанол - ацетонитрил - этанол - диоксан - тетрагидрофуран - 2-пропанол - 1-пропанол [1].

Следует отметить, что выбор элюента и оптимизация условий разделения – задача достаточно сложная. В литературе описаны различные способы оптимизации состава элюента, как для изократического, так и для градиентного элюирования [4-8].

Современный жидкостный хроматограф – сложный автоматизированный прибор. Все узлы такого прибора по своей сути являются вспомогательными элементами по отношению к колонке, где протекает процесс разделения. Необходимые компоненты любого хроматографа – насос, дозатор и детектор. С помощью насоса в колонку подаётся элюент. Дозатор необходим для ввода в колонку пробы заданного объёма. Функция детектора заключается в регистрации количества анализируемого вещества, растворённого в подвижной фазе, в виде электрического сигнала [3].

### 3.2 Детектирование в ВЭЖХ

Детекторы характеризуются пределом обнаружения, линейным динамическим диапазоном и быстродействием. Детекторы, используемые в ВЭЖХ, должны обладать высокой чувствительностью, достаточным быстродействием, иметь широкий линейный динамический диапазон, позволять получать как качественную, так и количественную информацию о составе пробы, а также обладать стабильностью работы [9].

Различают специфические и неспецифические детекторы. Неспецифический детектор регистрирует общую характеристику подвижной фазы, например показатель преломления или электропроводность (в этом случае детектируемое вещество измеряется косвенно по изменению характеристики подвижной фазы). Специфические детекторы избирательно реагируют на соединения, имеющие какое-либо общее характерное свойство. Примером такого детектора служит УФ-фотометр, измеряющий поглощение в УФ области спектра [1].

#### 3.2.1 Детектирование веществ по поглощению в УФ области спектра

Детектирование по поглощению в УФ области спектра в настоящее время является наиболее популярным способом регистрации веществ в ВЭЖХ [10]. Это объясняется тем, что УФ детектор обладает достаточно высокой чувствительностью ( $10^{-9}$  г вещества в пробе), относительно прост в аппаратном оформлении, доступен для большинства лабораторий. На сегодняшний день существует четыре основных вида УФ детекторов:

1. УФ детекторы с фиксированной длиной волны, которую выбирают с помощью специальных светофильтров;
2. УФ детекторы с монохроматором, который позволяет устанавливать любую длину волны в своем диапазоне;
3. многоканальные детекторы с быстро автоматически перестраиваемым монохроматором, позволяющие осуществлять регистрацию одновременно на нескольких длинах волн;
4. диодно-матричные детекторы (ДМД), позволяющие получать полную спектральную информацию в заданном диапазоне.

Детекторы двух последних типов относятся к т.н. спектральным, или многоканальным, детекторам. В отличие от детекторов 3-го типа, для ДМД характерен более высокий уровень флуктуационных шумов и значительный дрейф нулевой линии. Среди многоканальных детекторов особо можно отметить прецизионный детектор хроматографов серии "Милихром", который обладает высокими метрологическими характеристиками [11]. Спектрофотометрический детектор хроматографа "Альфахром" позволяет регистрировать поглощение элюата одновременно на нескольких (до восьми) длинах волн и получать спектральную информацию в процессе анализа, что существенно повышает надежность идентификации веществ-аналитов.

### 3.3 Построение теоретических хроматограмм

Оптимизация условий анализа - одна из наиболее актуальных задач ВЭЖХ. Её можно решать путём проб и ошибок, что связано с затратами реактивов и времени. Более рациональный путь решения –

прогнозирование хроматографического поведения веществ-аналитов в зависимости от их свойств и условий проведения анализа.

Хроматограмма представляет собой зависимость отклика детектора от объёма подвижной фазы, прошедшей через колонку. Чтобы построить теоретическую хроматограмму, эту зависимость надо определить однозначно. Для этого необходимо рассчитать объёмы удерживания и площади всех пиков (в случае многоканального детектирования – площади, соответствующие каждому каналу), а также дисперсию, определяющую форму пиков. В литературе описаны различные подходы к расчёту перечисленных хроматографических параметров.

### 3.4 Расчёт объёмов удерживания веществ в ВЭЖХ

За время существования метода ВЭЖХ было опубликовано большое количество работ, посвященных разработке алгоритмов и уравнений для расчёта хроматографических параметров веществ, в частности объёмов удерживания. В литературе описаны два основных подхода к решению данной задачи: первый - расчёт удерживания, основанный на молекулярной структуре вещества [12-18]; второй - вычисление удерживания из эмпирических соотношений на основании данных, полученных из предварительных экспериментов [19, 20].

#### 3.4.1 Расчёт объёмов удерживания на основе молекулярного строения вещества

Первые шаги к теоретическому описанию хроматографического удерживания на основании молекулярного строения вещества были предприняты С. Хорватом [12]. Позднее его теория была развита немецкими учёными Д. Мартиром и К. Диллом [13,17]. Согласно этой теории, свободная энергия сорбции вещества-аналита на неподвижной фазе зависит главным образом от гидрофобных, электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий вещества с неподвижной фазой и элюентом, а также элюента и неподвижной фазы между собой, и удерживание вещества можно рассчитать, если учесть эти взаимодействия [17].

Основная сложность использования этой модели заключается в невозможности учёта всех взаимодействий между веществами в хроматографической системе, что существенно ограничивает её применимость для расчёта удерживания. Тем не менее, в литературе описано несколько различных подходов к учёту молекулярных взаимодействий между фазами и аналитом:

1. Удерживание в ОФ ВЭЖХ авторы [17] рассматривают как результат электростатических взаимодействий и обмена протонами и электронами между молекулами аналита и неподвижной фазой. Данная концепция была впервые представлена Хильдебрандом для описания регулярных растворов и доработана Тиссенем и Схунмакерсом для ВЭЖХ. Она даёт качественное представление процесса удерживания, однако не может быть использована для расчёта из-за многочисленных упрощений и неопределённостей.

2. Одна из наиболее распространённых в настоящее время моделей для расчёта удерживания базируется на полуэмпирическом уравнении (1):

$$\log k' = a + b \cdot n_c, \quad (1)$$

где  $b$  – вклад в величину  $\log k'$ , соответствующий одному атому углерода  $n_c$  – количество атомов углерода в соединении,  $a$  – константа, закономерно уменьшающаяся с увеличением полярности веществ. С помощью

этой модели рассчитывают удерживание углеводов одного гомологического ряда. Чёткой зависимости значений констант от класса соединений нет, поэтому их определяют экспериментально [3].

3. Данная модель предлагает механизм удерживания, схематично представленный на рис. 3. Основными критериями, определяющими удерживание, являются энергия формирования вакансии для молекулы аналита в неподвижной фазе, а также, электростатические и "гидрофобные" взаимодействия аналита с неподвижной фазой, определяемые площадью поверхности молекулы [12,14]. При этом не

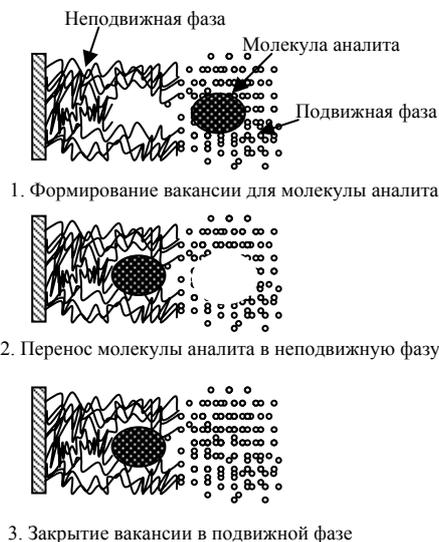


Рис. 3. Механизм удерживания аналита в неподвижной фазе, предложенный С. Хорватом

молекулы, её геометрия, вращение фрагментов вокруг  $\sigma$ -связей. Недостаток этой модели в том, что все расчёты производятся для отдельной молекулы без учёта влияния среды (подвижной фазы). Классический пример её применения был показан авторами работ [15,16]. Они вычисляли коэффициенты ёмкости веществ в обращено-фазовой хроматографической системе с использованием воды и ацетонитрила в качестве элюентов из соотношения

$$k' = -211 + 82,6 \text{Info}\chi + 9,2 D_{\max} - 0,32 \text{Plan} . \quad (2)$$

Параметры  $\text{Info}\chi$  и  $D_{\max}$  отражают "гидрофобность" молекулы, а  $\text{Plan}$  – её геометрию – поверхность, доступную для взаимодействия с неподвижной фазой. Коэффициент корреляции вычисленных величин  $k'$  с полученными экспериментально составил 0,99. Параметры  $\text{Plan}$ ,  $\text{Info}\chi$  и  $D_{\max}$  вычислялись из системы уравнений, полученной из предварительных экспериментов при варьировании состава подвижной фазы. Данный метод расчёта удерживания даёт хороший результат, однако применяемый способ вычисления параметров абсолютно не отражает физического смысла модели, что фактически делает её эмпирической. Аналогичный алгоритм был описан в работах [13,18].

Отличие всех вышеперечисленных моделей состоит только в типах учитываемых взаимодействий, но не в способе расчёта: авторы работ [12-18] учитывали силы, влияющие на удерживание, как суперпозицию отдельных взаимодействий в хроматографической системе. Основная сложность применения такого подхода для расчёта удерживания заключается в трудности, а зачастую невозможности измерения вклада того или иного взаимодействия молекулы аналита с хроматографической системой в удерживание.

учитывается влияние неподвижной фазы (С. Хорват показал, что в ОФ ВЭЖХ оно очень мало по сравнению с влиянием подвижной фазы [12]).

4. Модель, предлагающая количественные соотношения "структура-удерживание" (quantitative structure-retention relationships, или QSRR) рассматривает удерживание с точки зрения квантовой механики, и является, пожалуй, наиболее развитой на сегодняшний день среди всех теорий вычисления удерживания на основе молекулярного строения вещества. При расчёте объёмов удерживания ( $V_R$ ) учитываются электронное строение

### 3.4.2 Расчёт объёмов удерживания на основе эмпирических соотношений

#### Зависимость коэффициента ёмкости от состава подвижной фазы

В жидкостной хроматографии коэффициент ёмкости анализируемого соединения ( $k'$ ) является функцией концентрации сильного компонента подвижной фазы ( $c$ ). В случае ОФ ВЭЖХ эта зависимость может быть описана соотношением, предложенным в работе [20]:

$$\log k' \approx \log k'_0 - n \cdot c + m \cdot c^2 \quad (3)$$

где  $k'_0$ ,  $m$  и  $n$  – константы, определяемые экспериментально.  $k'_0$  – коэффициент ёмкости анализируемого соединения в отсутствие сильного компонента подвижной фазы. Однако вклад члена  $m \cdot c^2$  сказывается лишь тогда, когда рассматривается очень широкий диапазон  $c$ . На практике при измерении коэффициентов ёмкости нецелесообразно выходить за пределы  $1 < k' < 20$ . Поскольку этим пределам отвечает достаточно узкий диапазон  $c$ , чаще всего используют упрощённое выражение [3,20-22]:

$$\log k' \approx \log k'_0 - n \cdot c, \text{ или } k' \approx k'_0 \cdot 10^{-nc}. \quad (4)$$

Существует другое соотношение для описания зависимости  $k'$  от  $c$ :

$$\ln k' = a - \frac{d \cdot c}{1 + b \cdot c} + h \cdot c, \quad (5)$$

где  $a$ ,  $b$ ,  $d$  и  $h$  – параметры, определяемые из экспериментальных данных. Это соотношение было использовано авторами работы [23] для расчёта  $k'$  восьми катехоламинов в обращено-фазовой системе с использованием подвижных фаз состава метанол-вода и ацетонитрил-вода. Различие вычисленных и экспериментальных величин  $k'$  составило от 2 до 9% в системе метанол-вода и от 3 до 18% в системе ацетонитрил-вода. Нетрудно видеть, что, приняв  $b$  или  $d$  равными нулю, мы получим уравнение (4).

#### Нахождение констант $k'_0$ и $n$

В литературе описаны два метода экспериментального определения констант  $k'_0$  и  $n$  из уравнения (4). Согласно первому, записывают несколько хроматограмм вещества в изократическом режиме с различными концентрациями органического растворителя в подвижной фазе. Затем строят график зависимости  $\log k' = f(c)$ , из которого находят искомые константы (рис. 4).

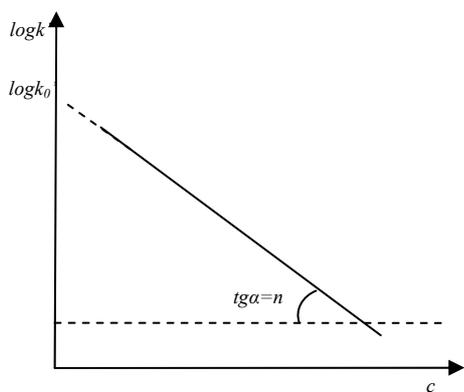


Рис.4. Нахождение констант  $k'_0$  и  $n$  из графика зависимости  $\log k'(c)$

Иначе константы можно найти из двух хроматограмм, записанных в градиентном режиме. Для этого нужно записать соотношение (14) (см. страницу 16) для каждого эксперимента, составить из них систему уравнений и решить её относительно  $k'_0$  и  $n$  [24].

Преимущество второго метода перед первым заключается в экономии времени и элюентов, однако для его применения необходима высокая точность формирования градиента насосами хроматографа, что делает его чувствительным к особенностям гидравлической системы конкретного прибора. Кроме того, систему уравнений для нахождения констант можно решить только численными методами. Вычисления ещё более усложняются, если учитывать, что градиент начинается не в начале хроматограммы, а задерживается на величину объёма

соединительных капилляров между смесителем и колонкой. В микроколоночной ВЭЖХ этот объём сравним с объёмом колонки, и поэтому эффектом задержки градиента нельзя пренебречь.

### Зависимость коэффициента ёмкости от температуры

Коэффициент ёмкости  $k'$  также зависит от температуры. Эта зависимость описывается уравнением Вант-Гоффа:

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

где  $\Delta H$  и  $\Delta S$  - парциальные молярные вклады энтальпии и энтропии в распределение образца между двумя фазами,  $R$  - универсальная газовая постоянная,  $T$  - абсолютная температура, а  $\frac{n_s}{n_m}$  - отношение объёмов неподвижной и подвижной фаз в колонке, называемое фазовым отношением колонки.

Упрощённо влияние температуры на  $k'$  можно описать зависимостью

$$\log k' = \frac{a}{T} + b, \quad (7)$$

где  $a$  и  $b$  - константы [25,26].

### Расчёт объёма удерживания

Коэффициент ёмкости, или фактор удерживания, по определению, равен

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0}, \quad (8)$$

где  $V_R$  - объём удерживания вещества, а  $V_0$  - свободный объём колонки.

С учётом (4) это выражение преобразуется к виду

$$V_R = V_0 \cdot (k_0' \cdot 10^{-nc} + 1) \quad (9)$$

При изократическом элюировании состав подвижной фазы постоянен, а при градиентном является функцией объёма элюата:

$$c = f(V). \quad (10)$$

Эта функция может быть как простой (например, линейной), так и очень сложной.

В общем виде она может быть описана следующим образом:

$$c = (A^\chi + B \cdot V)^\chi. \quad (11)$$

Параметр  $\chi$  применяется для описания градиентов нелинейной формы [20]. В дальнейшем для простоты будет рассматриваться только случай линейного градиента, т.е. когда  $\chi=1$ . Константы  $A$  и  $B$  в уравнении (11) вычисляются из начальных и конечных условий эксперимента;  $V$  - объём элюата к моменту достижения концентрации  $c$ . В начале эксперимента, когда  $V=0$ ,  $A=c_0$  - начальной концентрации сильного компонента подвижной фазы. Наклон (крутизна) градиента находится из уравнения

$$B = \frac{c_k - c_0}{V_y}, \quad (12)$$

где  $c_k$  – концентрация сильного компонента в конце градиента;  $V_y$  – объём элюата к моменту достижения концентрации  $c_k$ .

При градиентном элюировании увеличение объёма элюата на малую величину  $dV$  влечёт за собой сдвиг зоны вещества в колонке на долю её объёма  $dV_0$ . При бесконечно малом изменении объёма элюата состав подвижной фазы и, следовательно,  $k'$  можно считать неизменным. Тогда можно записать соотношение для  $k'$  аналогично случаю изократического элюирования:

$$k' = \frac{dV}{dV_0}. \quad (13)$$

Интегрируя (13) с учётом (11), для линейного градиента получаем следующее соотношение:

$$\int_0^{V_0} dV_0 = \int_0^{V'_{R(g)}} \frac{1}{k'} dV = \frac{1}{k_0'} \cdot \int_0^{V'_{R(g)}} 10^{n(A+B \cdot V)} dV \quad (14)$$

↓

$$V'_{R(g)} = \frac{1}{n \cdot B} \cdot \log[2.3n \cdot B \cdot V_0 \cdot k_0' \cdot 10^{-nc_0} + 1], \quad (15)$$

где  $V'_{R(g)}$  – объём удерживания вещества, уменьшенный на величину  $V_0$  (т.н. "приведённый" объём удерживания [2]).

При элюировании в кусочно-линейном градиенте перемещение вещества по колонке на  $i$ -том линейном участке градиента связано с объёмом градиента соотношением, аналогичным (14):

$$\int_0^{V_{0i}} dV_0 = \int_0^{V_i} \frac{1}{k'} dV = \frac{1}{k_0'} \cdot \int_0^{V'_{R(g)}} 10^{n(A_i+B_i \cdot V)} dV, \quad (16)$$

где  $V_{0i}$  – часть свободного объёма колонки, которую проходит при этом зона вещества. Очевидно, что когда вещество выходит из колонки

$$\sum_i V_{0i} = V_0.$$

↓

$$V'_{R(g)} = \sum_i V_i - V_{0i} = \sum_i \frac{1}{n \cdot B_i} \cdot \log[2.3n \cdot B_i \cdot V_{0i} \cdot k_0' \cdot e^{2.3nA_i}] - \frac{A_i}{B_i} \quad (17)$$

В частном случае кусочно-линейного градиента – линейном градиенте с предшествующим изократическим шагом – уравнение (17) принимает вид

$$V'_{R(g)} = V_z + \frac{1}{n \cdot B} \cdot \log \left[ 2.3n \cdot B \cdot \left( V_0 - \frac{V_1}{k_1'} \right) \cdot k_0' \cdot 10^{-nc_0} + 1 \right], \quad (18)$$

где  $V_z$  – объём задержки градиента,  $k_1'$  – коэффициент ёмкости вещества на первом, изократическом шаге,  $c_0$  – концентрация органического растворителя в подвижной фазе в начале градиента. Приведённый метод расчёта удерживания был предложен чешскими исследователями П. Яндерой и Я. Хурачком [20]. Сами авторы применили его для вычисления объёмов удерживания широкого ряда веществ, и различие вычисленных и экспериментально полученных величин  $V_R$  не превысило 8%. Однако следует отметить, что объём колонки, использованной П. Яндерой в данном эксперименте, существенно превышал объём

задержки градиента, поэтому вычисления производились с использованием соотношения (15). Проверка пригодности уравнения (18) для расчёта объёмов удерживания не проводилась.

### 3.5 Расчёт параметров хроматографического пика

#### 3.5.1 Форма хроматографического пика

В идеальном случае хроматографические пики описываются кривой Гаусса [25,27,28]. Однако на практике из-за конечных концентраций образца, неоднородностей в неподвижной фазе, наличия мёртвого объёма системы и ряда других факторов симметричность пиков в той или иной степени нарушается. Форма гауссова пика описывается следующим образом:

$$c(V) = \frac{S}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left[-0,5 \cdot \left(\frac{V - V_R}{\sigma}\right)^2\right], \quad (19)$$

где  $c(V)$  - величина отклика детектора, отражающая изменение концентрации вещества,  $S$  – площадь пика,  $\sigma$  – стандартное отклонение, характеризующее ширину пика. В случае градиентного элюирования оно может быть вычислено из соотношения

$$\sigma = \frac{V_{R(iso)}}{\sqrt{N}}. \quad (20)$$

$V_{R(iso)}$  в этом уравнении - объём удерживания вещества при изократическом элюировании с концентрацией сильного компонента подвижной фазы  $c_{max} = c(V_R)$  [19],  $N$  – эффективность колонки. Поскольку при изократическом элюировании часть вещества в колонке постоянно находится в подвижной фазе, зона размывается посредством диффузии на протяжении всего времени пребывания вещества в колонке. При градиентном элюировании до тех пор, пока концентрация сильного компонента подвижной фазы не достигнет определённой величины, вещество практически полностью сорбировано на колонке и не подвержено диффузии. Затем, в связи с ростом концентрации сильного компонента, оно быстро покидает колонку. По этой причине величины  $\sigma$  при градиентном элюировании всегда меньше, чем при изократическом, и соотношение (20) позволяет лишь приблизительно рассчитать величину  $\sigma$ .

#### 3.5.2 Ширина хроматографического пика

Величину стандартного отклонения хроматографического пика также можно определить из следующего уравнения [25]:

$$\sigma = \frac{w_{1/2}}{2,354}, \quad (21)$$

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

П. Яндера в работе [20] предложил аналитическое уравнение для расчёта ширины пика на половине высоты. Для случая изократического элюирования оно имеет следующий вид:

$$w_{1/2} = \frac{2,354V_0}{\sqrt{N}} \{k'_0 \cdot 10^{-nc} + 1\}. \quad (22)$$

Расчёт ширины пика при градиентном элюировании проводится аналогичным образом, только вместо постоянной концентрации сильного компонента подвижной фазы  $c$  подставляется функция  $c(V)$ , описывающая форму градиента. В случае линейного градиента уравнение (22) принимает вид:

$$w_{1/2} \approx \frac{2,354V_0}{\sqrt{N}} \left\{ k'_0 \cdot 10^{-n[A+B(V'_{R(g)}-V'_z)]} + 1 \right\} \quad (23)$$

Авторами работы [29] был предложен другой метод расчёта ширины хроматографических пиков при градиентном элюировании, основанный на следующем уравнении:

$$w_{1/2} = a + b \cdot k_{\text{вых}}, \quad (24)$$

где  $k_{\text{вых}}$  – коэффициент ёмкости вещества в подвижной фазе того состава, при котором оно покидает колонку,  $a$  и  $b$  – константы, определяемые экспериментально. Они индивидуальны для каждого вещества и хроматографической системы. Эти константы определяли из предварительных экспериментов: записывали по две хроматограммы каждого вещества с различным  $k_{\text{вых}}$ , из них вычисляли  $w_{1/2}$ , записывали соотношение (24), соответствующее каждому  $k_{\text{вых}}$ , и решали полученную систему уравнений относительно  $a$  и  $b$ .

В работе [29] приведена сравнительная характеристика рассмотренных методов расчёта ширины пика, представленная на основании результатов двенадцати экспериментов, проведённых в градиентном режиме, причём в условиях четырёх различных градиентов. Ошибка расчёта ширины пиков из соотношения (24) не превысила 10%, в то время как отличие экспериментально полученных результатов от вычисленных из соотношения (23) достигало 56%.

Недостатком метода расчёта ширины пиков, приведённого в работе [29], является необходимость проведения большого числа предварительных экспериментов, что делает его более трудоёмким по сравнению с альтернативным методом расчёта из работы [19].

### 3.5.3 Связь площади пика с концентрацией вещества в образце

В хроматографии количество вещества в образце, введенном в колонку, равно количеству вещества в соответствующем ему хроматографическом пике, поэтому справедливо уравнение материального баланса:

$$Q_S = V_S \cdot c_S = \int c dV, \quad (25)$$

где  $Q_S$  – количество определяемого вещества в образце,  $V_S$  – объём вводимой пробы,  $c_S$  – концентрация вещества в пробе,  $V$  – текущий объём элюата,  $c$  – концентрация вещества в элюате в момент детектирования.

При детектировании веществ по поглощению в УФ области спектра мерой концентрации является оптическое поглощение раствора вещества, которое линейно связано с концентрацией согласно закону Бугера-Ламберта-Бера:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l, \quad (26)$$

где  $A_\lambda$  – оптическое поглощение раствора вещества на длине волны  $\lambda$ ,  $\varepsilon_\lambda$  – молярный коэффициент экстинкции раствора вещества при длине волны  $\lambda$ ,  $c$  – молярная концентрация вещества в растворе,  $l$  – длина оптического пути.

Величина отклика детектора является мерой концентрации анализируемого вещества, а площадь пика – мерой его количества, поэтому справедливо соотношение

$$S = S_0 \cdot V_S \cdot c_S = \int AdV, \quad (27)$$

где  $S_0$  – коэффициент пропорциональности, связывающий площадь пика с количеством вещества в образце. Он имеет физический смысл удельной площади пика [28].

### 3.6 Заключение

С развитием компьютерных технологий появились специальные программы, позволяющие моделировать хроматографическое поведение веществ-аналитов в зависимости от условий проведения анализа и генерировать хроматограммы. Типичные примеры таких программ - Drylab<sup>®</sup>, разработанная Л. Шнайдером [6,7], ChromSword<sup>®</sup> (Merck, Германия) [30], ACD/HPLC Simulator<sup>®</sup> (Chemistry Development, Канада) [31]. Из новейших разработок следует упомянуть программу IonChrom<sup>®</sup> для ионной хроматографии, разработанную российскими исследователями [32].

Представленные в литературе компьютерные программы не эмулируют работу определённого хроматографа, и могут быть использованы для обучения только "теоретической" хроматографии. Кроме того, они весьма полезны для оптимизации условий анализа. В основе их алгоритмов лежат уравнения (4) и (7) для расчёта коэффициентов ёмкости веществ и уравнение (19) для расчёта параметров хроматографических пиков и генерирования хроматограмм. В программе ChromSword<sup>®</sup> также реализована возможность расчёта объёмов удерживания веществ на основе их молекулярного строения с помощью уравнения (1). Для этого необходимо получить экспериментально и ввести в программу параметры, необходимые для вычисления величин  $k'$ . Однако, несмотря на широкие возможности представленных методов расчёта хроматографических параметров, в настоящее время нет компьютерных программ, моделирующих работу реального хроматографа и обучающих практической работе с оборудованием. В связи с этим, задача разработки компьютерного тренажёра "Жидкостный хроматограф" представляется нам актуальной.

## 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 4.1 Оборудование

ВЭЖХ проводили на хроматографе "Альфахром" (ЗАО Институт хроматографии "Эконова", г. Новосибирск) с колонкой  $\varnothing 2 \times 75$  мм, заполненной сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ ("Bischoff Analysentechnik und Geräte GmbH", Германия).

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

Расчёт хроматографических параметров и графическое представление генерированных хроматограмм проводили с помощью компьютерной программы "Microsoft® Excel 2003" ("Microsoft Corp.", США) [33].

Расчёт объёмов удерживания проводили с помощью компьютерной программы "VrFinder" (разработчик: Е. Г. Барам, студент 2 курса ММФ НГУ).

Использовали весы аналитические электронные "Adventurer AR0640" ("Ohaus", Швейцария), погрешность взвешивания  $\pm 0,2$  мг; автоматические пипетки переменного объема  $20 \div 200$  мкл ( $20 \text{ мкл} \pm 4\%$ ;  $200 \text{ мкл} \pm 0,25\%$ ) и  $100 \div 1000$  мкл ( $100 \text{ мкл} \pm 2\%$ ;  $1000 \text{ мкл} \pm 0,45\%$ ) со сменными наконечниками "Ленпипет Колор" (ЗАО "ТермоЛабсистемс", г. Санкт-Петербург); пробирки стеклянные вместимостью 10 мл, пробирки центрифужные из полипропилена вместимостью 1,5 мл; колбы мерные ( $25 \text{ мл} \pm 0,32\%$ ;  $200 \text{ мл} \pm 0,15\%$ ); цилиндр мерный вместимостью 25 мл, стакан вместимостью 50 мл.

### 4.2 Материалы

Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил для ВЭЖХ "сорт 0" (НПК "Криохром", г. Санкт-Петербург) и раствор  $4\text{M LiClO}_4$  и  $0,1\text{M HClO}_4$  в воде (ЗАО "Эконова", г. Новосибирск).

Аттестованная тестовая смесь для проверки пригодности хроматографической системы имела состав, указанный в таблице 1.

**Таблица 1.** Состав раствора для тестирования хроматографической системы.

Наименование компонента	Массовая концентрация, мг/мл
Бромид калия	0,2
Уридин	0,2
Кофеин	1,0
<i>m</i> -Нитроанилин	0,1
<i>o</i> -Нитроанилин	0,1
Растворитель - смесь ацетонитрила с водой с объёмной долей ацетонитрила 2%	

Список и структурные формулы веществ-аналитов, использованных в работе, приведены в *Приложении 1*. Содержание основного вещества в использованных реактивах составляло не менее 95%. В качестве растворителей для приготовления растворов веществ применяли метанол "х.ч." и дистиллированную воду.

## 4.3 Методы

### 4.3.1 Приготовление растворов

Элюент А (0,2М LiClO<sub>4</sub> и 0,005М HClO<sub>4</sub> в воде) готовили согласно методике [34].

Исходные растворы веществ №№ 1 - 29 с концентрацией по 2 мг/мл готовили следующим образом: в пробирку вместимостью 10 мл вносили 10 мг вещества (точная навеска) и растворяли в воде (вещ-ва № 1 – 15, 26 - 29) или в метаноле (вещ-ва № 16 - 25). Для приготовления рабочих растворов с концентрацией 0,2 мг/мл исходные растворы разбавляли соответствующим растворителем в соотношении 1:9 по объёму.

Для приготовления раствора индигокармина с концентрацией 0,8 мг/мл в мерную колбу вместимостью 25 мл вносили 20 мг вещества и растворяли в воде.

### 4.3.2 Контроль правильности работы хроматографической системы (валидация хроматографа)

Валидацию проводили с использованием процедуры, регламентированной методикой [34]. Хроматографировали тестовый раствор, и из полученных хроматограмм вычисляли 14 параметров, каждый из которых контролирует определенный показатель хроматографической системы:  $V_R$  бромид-иона – свободный объем колонки; спектральное отношение  $S_{280}/S_{250}$  уридина – точность настройки детектора в диапазоне от 250 до 280 нм; спектральное отношение  $S_{260}/S_{280}$  кофеина – линейный диапазон детектора; спектральное отношение  $S_{260}/S_{230}$  *m*-нитроанилина – рН элюента А. По пику *o*-нитроанилина контролировали:  $V_R$  – отклонение градиента от заданной формы; спектральные отношения  $S_{\lambda}/S_{210}$  – точность настройки детектора в диапазоне от 210 до 300 нм; асимметрия пика  $A_{10\%}$  – нарушения в упаковке колонки; площадь пика  $S_{210}$  – точность дозирования образца;  $w_{1/2}$  (ширина пика *o*-нитроанилина на полувысоте) – эффективность колонки.

### 4.3.3 Определение свободного объёма хроматографической колонки весовым методом

Колонку с помощью насоса хроматографа заполняли водой и взвешивали. Затем колонку высушивали в сушильном шкафу в течение 900 минут при температуре 110 °С до постоянного веса и снова взвешивали. Свободный объём находили по разности масс заполненной водой и высушенной колонки.

### 4.3.4 Определение объёма задержки градиента

Объём задержки (сдвига) реально обрабатываемого градиента относительно заданного определяли методом "псевдохроматографии" с капилляром из фторопласта ( $d_{внутр} = 0,5$  мм,  $l = 140$  мм) при детектировании на длинах волн 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм.

- Эксперимент 1: Элюент А: ацетонитрил.  
Элюент Б: раствор *o*-нитроанилина в ацетонитриле с концентрацией 0,02 мг/мл.  
Скорость потока: 50, 100, 200 мкл/мин.  
Систему промывали ацетонитрилом, затем подавали раствор *o*-нитроанилина в ацетонитриле.
- Эксперимент 2: Элюент А: [4М LiClO<sub>4</sub> – 0,1М HClO<sub>4</sub>]:H<sub>2</sub>O (5:95).  
Элюент Б: раствор *o*-нитроанилина в ацетонитриле с концентрацией 0,02 мг/мл.  
Скорость потока: 200 мкл/мин.  
Градиент: от 0 до 100% Б за 20 мин.

#### 4.3.5 Хроматографические методы

ВЭЖХ анализ веществ для формирования базы данных проводили в следующих условиях:

Элюент А: [4М LiClO<sub>4</sub> – 0,1М HClO<sub>4</sub>]:H<sub>2</sub>O (5:95).

Элюент Б: ацетонитрил.

Температура колонки: 40°C.

Объём вводимой пробы: 4 мкл.

Концентрация веществ: по 0,2 мг/мл.

Детектирование при восьми длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм одновременно.

Вещества были сгруппированы в несколько образцов, каждый из которых хроматографировали в изократическом режиме элюирования при разных концентрациях ацетонитрила в подвижной фазе. Диапазон изменения концентрации ацетонитрила выбирали в зависимости от гидрофобности веществ-аналитов.

Для исследования влияния температуры на хроматографическое удерживание веществ ВЭЖХ анализ проводили в следующих условиях:

- Эксперимент 1: смесь вещ-в № 13, 14, 25; изократический режим элюирования; 35% ацетонитрила; скорость потока: 200 мкл/мин; температура колонки: 40°, 50°, 60° и 70°C.
- Эксперимент 2: смесь вещ-в № 5, 10, 21, 23, 25; изократический режим элюирования; 50% ацетонитрила; скорость потока: 200 мкл/мин; температура колонки: 70°C.
- Эксперимент 3: смесь вещ-в № 5, 10, 21, 23, 25; градиент: 0 - 50% ацетонитрила за 1500 мкл; 50 – 100% ацетонитрила за 2300 мкл; скорость потока: 200 мкл/мин; температура колонки: 70°C.

Для проверки пригодности используемых методов расчёта хроматограмм вещества хроматографировали в градиентных условиях:

- Эксперимент 4: вещества № 1 – 28 сгруппировали в несколько проб и хроматографировали в условиях методики [34] – градиент: 5% - 100% ацетонитрила за 4000 мкл; скорость потока: 100 мкл/мин; температура колонки: 40°C.
- Эксперимент 5: смесь вещ-в № 2, 4, 5, 10, 21; градиент: 10% - 70% ацетонитрила за 3500 мкл; скорость потока: 100 мкл/мин; температура колонки: 40°C.
- Эксперимент 6: смесь вещ-в № 5, 15, 20, 25; градиент: 5 - 20% ацетонитрила за 1500 мкл; 20 – 100% ацетонитрила за 1500 мкл; скорость потока: 100 мкл/мин; температура колонки: 40°C.
- Эксперимент 7: без ввода пробы; градиент 0 – 100% ацетонитрила за 2000 мкл; скорость потока – 200 мкл/мин; температура колонки: 50°C.

Для контроля чистоты растворителей были записаны "холостые" хроматограммы (без ввода образца) в градиентном режиме элюирования.

#### 4.3.6 Измерение характеристик детектора

##### **Оценка дрейфа нулевой линии**

Кювету заменяли на имитатор кюветы, сигнал детектора записывали при длинах волн 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм одновременно в течение 90 минут на изначально непрогретом приборе в однолучевом и двухлучевом режимах.

## Измерение уровня шума детектора

Кювету заменяли на имитатор кюветы, сигнал детектора записывали на длинах волн 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм одновременно. Режим детектора: двухлучевой. Постоянная времени детектора: 0,06, 0,34, 2,60 и 20,80 с.

## Исследование диапазона стабильности спектральных отношений

Диапазон стабильности спектральных отношений исследовали методом "псевдохроматографии" с капилляром из фторопласта ( $d_{\text{внутр}} = 0.5$  мм,  $l = 220$  мм).

Элюент А: вода;

Элюент Б: раствор индигокармина в воде с концентрацией  $1,6 \cdot 10^{-3}$  М;

Скорость потока: 100 мкл/мин;

Градиент: 0 - 100% элюента Б за 10 мин.

Детектирование проводили при длинах волн 190, 200, 210, 220, 250, 260, 270, 280, 300, 310, 320, 340, 350, 360 нм.

### 4.3.7 Запись УФ спектров веществ

Записывали хроматограммы каждого вещества в условиях, регламентированных методикой [34]. В процессе элюции производили остановку потока во время нахождения в кювете детектора чистого элюата и записывали его УФ спектр ("нулевую линию"). Затем возобновляли поток, снова останавливали его во время нахождения вещества-аналита в кювете детектора (вблизи вершины хроматографического пика) и записывали УФ спектр элюата. Нулевая линия вычиталась из полученного УФ спектра автоматически. Критерием корректности полученного спектра считали различие оптической плотности в максимуме двух последовательно записанных спектров вещества-аналита не более 1%.

### 4.3.8 Исследование зависимости давления в системе от скорости потока элюента, состава подвижной фазы и температуры колонки

Отсоединяли от хроматографа клапан противодействия и записывали "холостые" хроматограммы, варьируя состав подвижной фазы, температуру колонки и скорость потока элюента в максимально широких пределах, предусмотренных техническими характеристиками хроматографа.

### 4.3.9 Оценка вклада клапана противодействия в общее давление в системе

Колонку заменяли клапаном противодействия. В процессе изократического элюирования записывали показания датчика давления хроматографа для подвижной фазы состава вода-ацетонитрил (0, 20, 60, 80 и 100% ацетонитрила) и скоростей потока 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 мкл/мин.

### 4.3.10 Исследование эффекта сжатия элюента

Колонку заменяли коротким пластиковым капилляром, оборудованным зажимом. В управляющей программе устанавливали максимальное давление 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 МПа и включали режим регенерации при скорости потока элюента 100 мкл/мин. После остановки насоса по достижении установленного давления зажим снимали, вытекший из капилляра элюент собирали в пробирку и взвешивали.

В качестве элюента использовали воду, ацетонитрил и смесь воды и ацетонитрила в соотношении 4:1.

#### 4.3.11 Оценка влияния качества смешивания элюентов на эффективность хроматографической системы

Штатный пассивный смеситель хроматографа (капилляр из нержавеющей стали типа "зигзаг") заменяли смесителем с активным перемешиванием элюентов (камера малого объема с магнитной мешалкой). В условиях, регламентированных методикой [34], записывали хроматограммы аттестованной тестовой смеси для проверки пригодности хроматографической системы при включенном и выключенном смесителе.

## 5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 5.1 Введение

Важнейшей функцией компьютерного тренажёра "Жидкостный хроматограф" является моделирование хроматограмм. Для расчёта и графического представления многоволновых хроматограмм нами был разработан алгоритм, позволяющий рассчитывать объёмы удерживания, площади и форму хроматографических пиков при любой длине волны от 190 до 360 нм. В основе расчёта объёмов удерживания веществ при градиентной элюции лежат эмпирические соотношения (4), (9) и (11). Вычисление параметров хроматографических пиков производится из уравнений (19) и (27). Для их использования необходимо знать следующие параметры: свободный объём колонки ( $V_0$ ), объём задержки градиента ( $V_z$ ) и три константы ( $k_0$ ,  $n$ , и  $S_0$ ), которые являются характеристиками вещества во всём диапазоне концентраций сильного компонента подвижной фазы. Эти параметры определяли экспериментально. Для 29 чистых веществ с различными свойствами составили базу данных всех параметров, необходимых для моделирования их хроматографического поведения. Вещества выбирали из соображений доступности, безопасности в работе, устойчивости в растворах и пригодности к введению в хроматограф.

Для эмульсии хроматограмм, максимально близких к экспериментальным, нами была смоделирована работа всех узлов хроматографа "Альфахром" в штатном и нештатном режимах. Для этого экспериментально исследовали характеристики детектора и гидравлической системы прибора.

### 5.2 Моделирование хроматограмм для градиентного режима элюирования при многоволновом детектировании

#### 5.2.1 Измерение свободного объёма колонки

Свободный (мёртвый) объём колонки ( $V_0$ ) – это часть объёма колонки, не занятая сорбентом, т.е. объём подвижной фазы в колонке [2]. В ВЭЖХ известно несколько способов измерения свободного объёма колонки: пикнометрический (весовой) способ, определение  $V_0$  по объёму удерживания несорбируемого вещества, по радиоактивным меткам, вводимым в элюент, по зависимости объёма удерживания гомологов от количества в них функциональных групп, экстраполированной к "нулевому" соединению в ряду [35].

Величину  $V_0$  мы определяли по объёму удерживания несорбируемого вещества. В качестве маркера свободного объёма использовали бромид-ион, поскольку он поглощает в УФ области спектра. Для используемой нами колонки  $V_0$  составил  $156 \pm 1$  мкл ( $n=10$ ).

Бромид-ион является гидрофильным веществом, в то время как неподвижная фаза в ОФ ВЭЖХ – гидрофобна. В связи с этим такой маркер свободного объёма мог исключаться из некоторых пор сорбента, что могло привести к заниженному результату при определении  $V_0$ . Для проверки этого предположения провели эксперимент, описанный в разделе 4.3.3. Свободный объём колонки вычислялся из следующего соотношения:

$$V_0 = \frac{M_{вод} - M_{сyx}}{\rho_{H_2O}}, \quad (28)$$

где  $M_{вод}$  и  $M_{сух}$  – соответственно масса колонки, заполненной водой, и масса высушенной до постоянного веса колонки. Плотность воды при температуре 30°C равна 0,9957 г/см<sup>3</sup> [36]. Результаты взвешивания колонки:

$$M_{вод}=37,0677\pm 0,0002 \text{ г};$$

$$M_{сух}=36,9082\pm 0,0002 \text{ г}.$$

Свободный объём колонки, измеренный весовым методом, составил 160±0,5 мкл (n=3).

Таким образом, оба метода определения  $V_0$  дали близкие результаты. Результат определения  $V_0$  весовым методом мы посчитали более правильным. В дальнейших расчётах мы использовали значение свободного объёма колонки 160 мкл.

### 5.2.2 Определение объёма задержки градиента

После начала анализа растворитель, состав которого сформирован в смесителе, попадает в колонку только после того, как он вытеснит весь объём элюента, находящийся в капилляре, соединяющем смеситель с колонкой. Этот объём равен объёму задержки (сдвига) градиента ( $V_z$ ).

Для определения  $V_z$  был проведён эксперимент в условиях, указанных в разделе 4.3.4. Когда ацетонитрил, содержащий *o*-нитроанилин, вытеснил из соединительного капилляра чистый ацетонитрил, детектор зарегистрировал увеличение оптической плотности. Результаты измерения  $V_z$  способом 1 приведены в таблице 2 и на рис. 5.

**Таблица 2.** Объёмы задержки градиента при различных скоростях потока элюента

Скорость потока, мкл/мин	$V_z$ , мкл
50	285
100	290
200	290

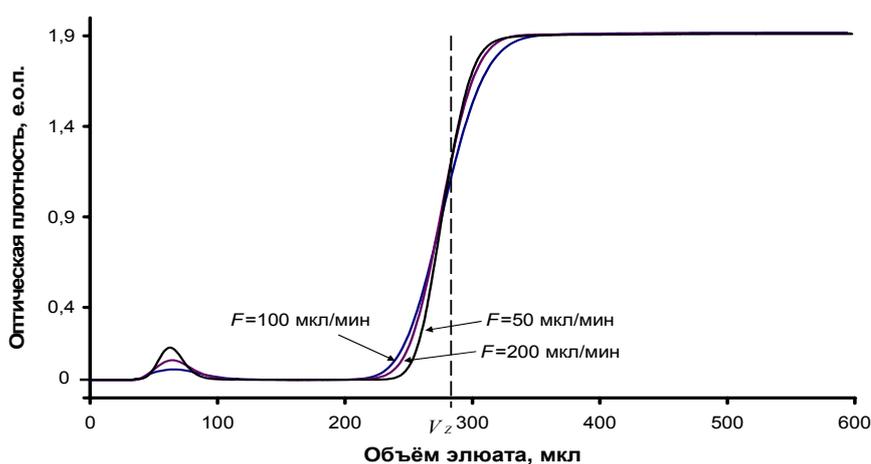


Рис. 5. Измерение объёма задержки ступенчатого градиента в режиме изократического элюирования.

Из полученных результатов видно, что при скачкообразном изменении состава подвижной фазы объём задержки мало зависит от скорости потока элюента и составляет 285-290 мкл.

Можно было ожидать, что при плавном изменении концентрации элюента Б (режим линейного градиента в системе вода-ацетонитрил) величина объёма задержки окажется другой. Для проверки этого предположения нами был проведён эксперимент, результаты которого показаны на рис. 6. На рисунке

виден рост оптической плотности по мере линейного увеличения концентрации элюента Б. Величину задержки определяли как точку пересечения усреднённой наклонной линии с осью X. Она составила 285 мкл, что совпадает с предыдущими результатами. Из рис. 6 также видно, что задаваемая форма градиента достаточно хорошо отрабатывается градиентным насосом хроматографа "Альфахром", что является предпосылкой для расчёта объёмов удерживания веществ с высокой точностью.

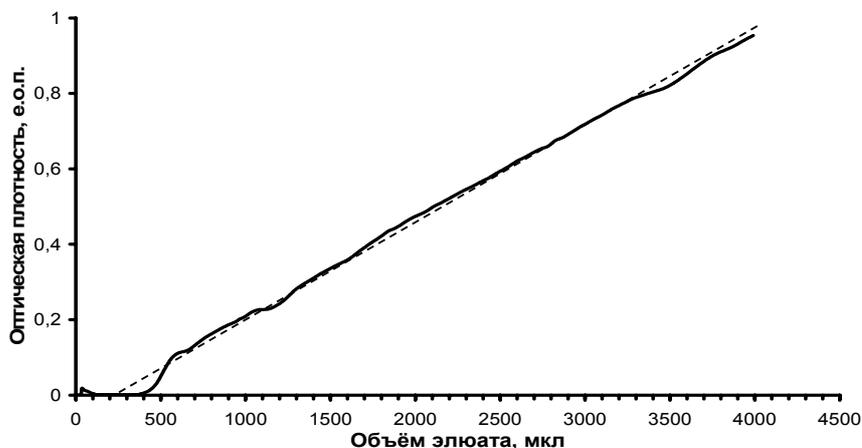


Рис. 6. Измерение объёма задержки градиента в режиме градиентного элюирования.  
 Элюент А: [4М LiClO<sub>4</sub> – 0,1М HClO<sub>4</sub>]:H<sub>2</sub>O (5:95);  
 Элюент Б: раствор *o*-нитроанилина в ацетонитриле с концентрацией 0,02 мг/мл.

### 5.2.3 Изучение зависимости коэффициентов ёмкости веществ от состава подвижной фазы

Исходные данные, необходимые для расчёта объёмов удерживания веществ (константы  $k_0'$  и  $n$  в уравнении (4)), были получены из хроматограмм, записанных в условиях, описанных в разделе 4.3.5. Коэффициенты ёмкости вычисляли по уравнению (8). Изучение зависимостей  $k'$  от состава подвижной фазы проводили, используя уравнение (4). Для 28 веществ были построены графики в координатах  $\log k' - c(CH_3CN)$ . Из рисунка, приведённого в *Приложении 2*, видно, что  $\log k'$  в рассматриваемых диапазонах концентраций линейно зависит от  $c(CH_3CN)$  (величины коэффициентов корреляции составили не менее 0.91). Эти зависимости имеют вид  $\log k' = \log k_0' - n \cdot c$  (см. уравнение (4)).

Из графиков для каждого из веществ были рассчитаны константы  $k_0'$  и  $n$ . Результаты приведены в *Приложении 3*.

Для расчёта (генерирования) многоволновой хроматограммы необходимо выполнить следующие процедуры:

1. Рассчитать объёмы удерживания всех веществ в образце и ширины их хроматографических пиков.
2. Смоделировать форму и вычислить площадь пика каждого вещества, входящего в состав хроматографируемого образца, на всех длинах волн детектирования.

### 5.2.4 Расчёт объёмов удерживания веществ при градиентном элюировании

Основываясь на методе расчёта объёмов удерживания веществ, описанном в разделе 3.4.2, мы разработали собственный алгоритм расчёта  $V_R$  в градиентной ВЭЖХ:

1. Вещество вводится в колонку и движется по ней в потоке элюента переменного состава. Зависимость состава подвижной фазы от объёма элюата задаётся функцией градиента  $c=f(V)$ . Вид этой функции мы задаём перед началом анализа.

2. Объём элюата условно разбивается на малые порции объёмом  $v$ . Состав подвижной фазы в малом объёме  $v$  элюата считаем постоянным. В колонку поступает малый объём  $v$  подвижной фазы. Зона вещества, согласно соотношению (9), при этом смещается по колонке на объём

$$V_{01} = \frac{v}{1 + k'_0 \cdot 10^{-nc_0}} \quad (29)$$

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

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

$$V_0 = \sum_{i=1}^m \frac{v}{1 + k'_0 \cdot 10^{-nc_i}} \quad (30)$$

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

$$V_R = v \cdot m \quad (31)$$

Расчёт величин  $V_R$  с помощью предложенного "пошагового" алгоритма легко реализуется на обычных персональных компьютерах. Его преимущество перед аналитическим методом расчёта, описанном в разделе 3.4.2, заключается в возможности быстрого расчёта объёма удерживания в условиях градиента любой сложности.

На рис. 7 представлено сравнение экспериментально полученных значений  $V_R$  для условий линейного градиента концентрации ацетонитрила с объёмами удерживания, вычисленными с применением вышеуказанного алгоритма. Были рассчитаны объёмы удерживания 28 из 29 выбранных соединений (вещество № 29 (бромид калия) не удерживается, и его  $V_R$  не вычисляли).

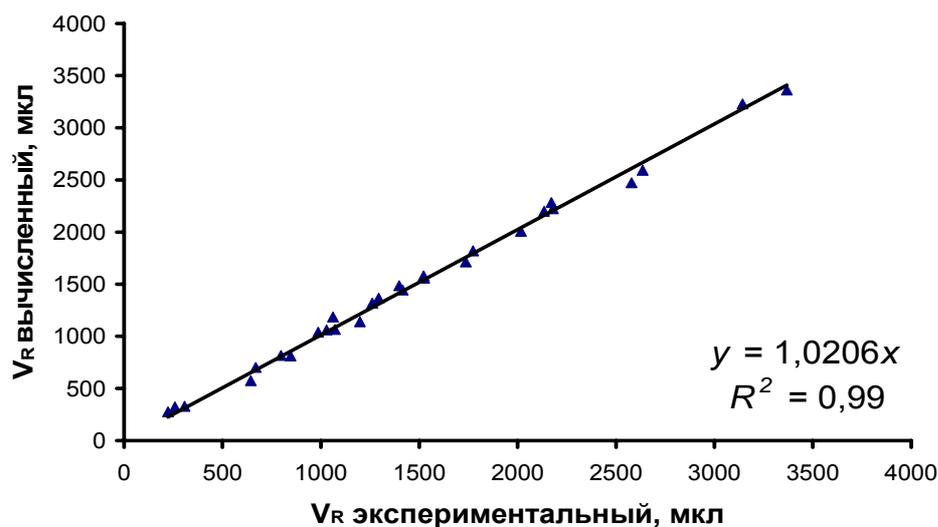


Рис. 7. Сравнение вычисленных и экспериментальных объёмов удерживания веществ. Условия хроматографирования соответствуют условиям из [34].

Из рис. 7 видно, что вычисленные объёмы удерживания хорошо согласуются с экспериментальными. Погрешность расчёта составила в среднем 4–6% и не превысила 12%. Таким

образом, описанный способ расчёта величин  $V_R$  пригоден для моделирования хроматограмм при градиентном режиме элюирования.

### 5.2.5 Влияние температуры колонки на хроматографическое удерживание

На рис. 8 показана зависимость коэффициентов ёмкости от температуры, полученная экспериментально для трёх веществ с разными свойствами. Полученные данные согласуются с уравнением (7), описывающим зависимость  $k'$  от температуры. Для трёх веществ величины коэффициентов корреляции составили 0,99.

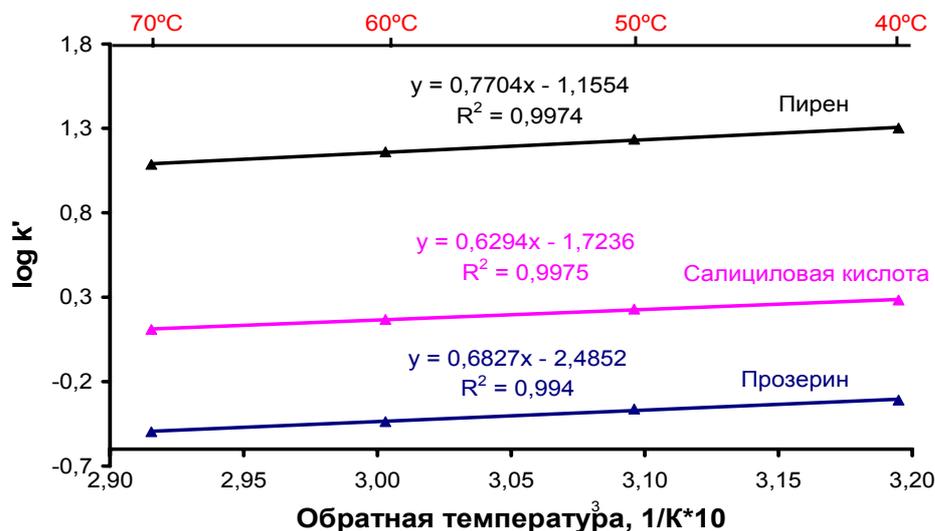


Рис. 8. Зависимость коэффициентов ёмкости от температуры (условия см. в разделе 4.3.5, эксперимент 1).

Из рис. 8 следует, что уравнение (7) позволяет с высокой точностью рассчитывать объёмы удерживания веществ-аналитов во всём диапазоне температур колонки, предусмотренном техническими характеристиками хроматографа "Альфахром".

На рис. 9 представлено сравнение экспериментально полученных значений  $V_R$  с объёмами удерживания, вычисленными с применением уравнений П. Яндеры для расчёта  $V_R$ , а также компьютерной программы на основе алгоритма, описанного в разделе 5.2.4, при температуре 70°C.

Для режима изократического элюирования оба метода расчёта величин  $V_R$  дали близкие результаты. Для режима градиентного элюирования результаты расчёта объёмов удерживания, полученные с помощью компьютерной программы, заметно лучше согласуются с экспериментальными данными, чем результаты, полученные по уравнениям П. Яндеры. Это видно из графиков, показанных на рис. 9. Кроме того, расчёт величин  $V_R$  с помощью разработанного нами "пошагового" алгоритма является для компьютера менее трудоёмкой процедурой, чем расчёт по уравнениям, и, следовательно, занимает меньше времени. В дальнейшем для расчёта объёмов удерживания использовали "пошаговый" алгоритм.

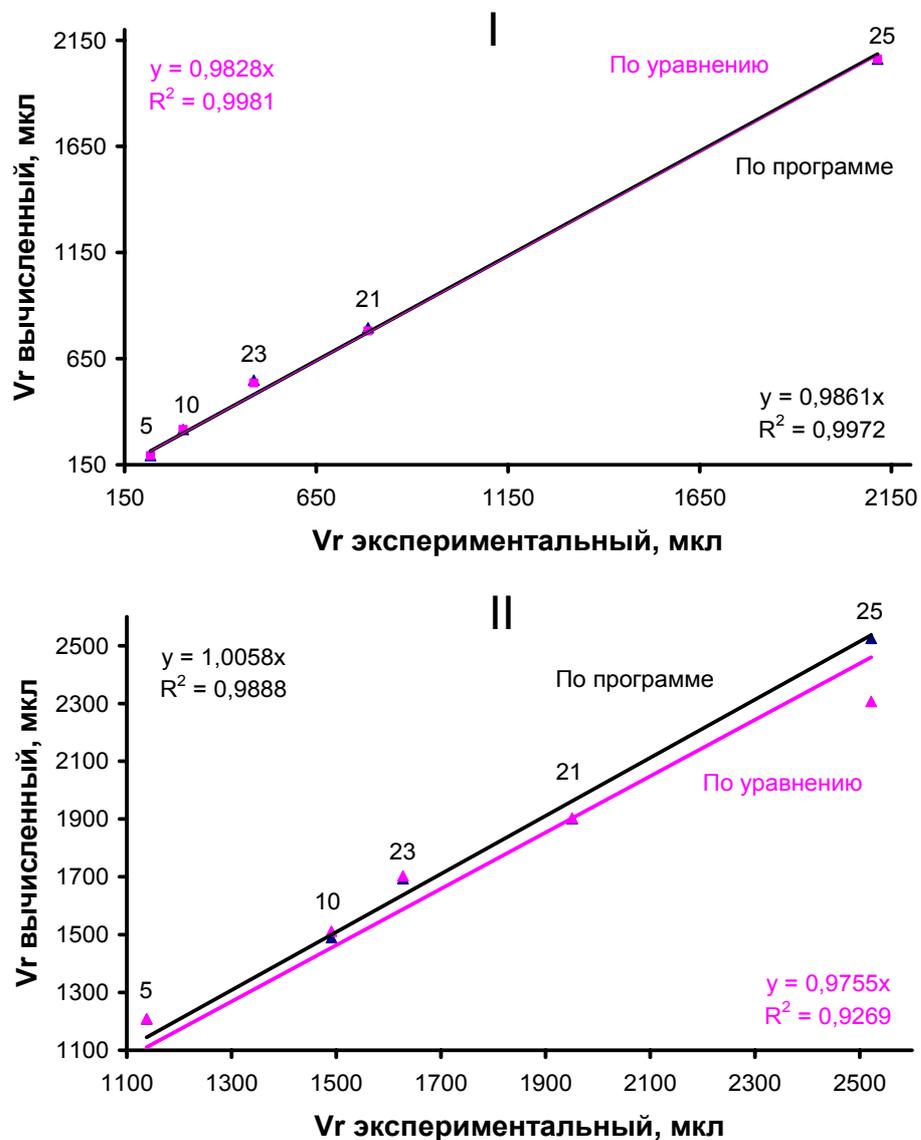


Рис. 9. Сравнение вычисленных и экспериментальных объёмов удерживания пяти веществ, хроматографированных в условиях изократического элюирования (I) и кусочно-линейного градиента(II), указанных в разделе 4.3.5 (эксперименты 2 и 3 соответственно). Номера точек соответствуют номерам веществ в *Приложении 2*.

### 5.2.6 Моделирование формы хроматографических пиков

Для построения хроматограмм с помощью компьютерного тренажёра мы исходим из приближения, при котором форма хроматографического пика соответствует уравнению Гаусса и описывается соотношением (19). Площади пиков могут быть вычислены из соотношения (27). Величины параметра  $S_0$  (удельной площади пика) для веществ № 1 - 29 были определены экспериментально: из трёх хроматограмм каждого вещества, записанных в одинаковых условиях в изократическом режиме, вычисляли среднюю площадь пика, и из соотношения (27) вычисляли  $S_0$ . Результаты представлены в *Приложении 3*. Полученные данные позволяют однозначно связать площадь пика каждого вещества с объёмом вводимой пробы и концентрацией аналита в ней, что является необходимым условием для моделирования хроматограмм близких к экспериментальным.

### 5.2.7 Вычисление спектральных характеристик веществ

УФ спектр вещества представляет собой зависимость оптического поглощения раствора этого вещества от длины волны. Для получения спектральных данных, необходимых для графического и табличного представления сгенерированных хроматограмм, мы использовали следующий алгоритм:

а) Во время хроматографирования вещества поток элюента останавливали вблизи максимума хроматографического пика и записывали спектр находящегося в кювете детектора раствора с автоматическим вычитанием спектра растворителя. Этот спектр, согласно закону Бугера-Ламберта-Бера, прямо связан с концентрацией вещества в растворе, но эта концентрация нам неизвестна.

б) Из полученного спектра вычисляли нормированный спектр путём деления величины поглощения при всех длинах волн на величину поглощения при  $\lambda = 210$  нм. Полученные значения спектральных отношений  $\frac{A_\lambda}{A_{210}}$  не зависят от концентрации и длины кюветы, т.к.

$$\frac{A_\lambda}{A_{210}} = \frac{\varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l}{\varepsilon_{210} \cdot c \cdot l} = \frac{\varepsilon_\lambda}{\varepsilon_{210}}. \quad (32)$$

в) Для получения спектра, связанного с концентрацией вещества, хроматографировали раствор с известной концентрацией вещества  $c^{эм}$  при  $\lambda = 210$  нм. Величину поглощения  $A_{210}^{эм}$  для раствора с концентрацией  $c^{эм}$  вычисляли из значения площади хроматографического пика  $S_{210}^{эм}$  по уравнению

$$A_{210}^{эм} = \frac{S_{210}^{эм}}{V_S^{эм}}, \quad (33)$$

где  $V_S^{эм}$  - объём введённой в колонку пробы.

Графически это можно представить схемой, приведённой на рис. 10.

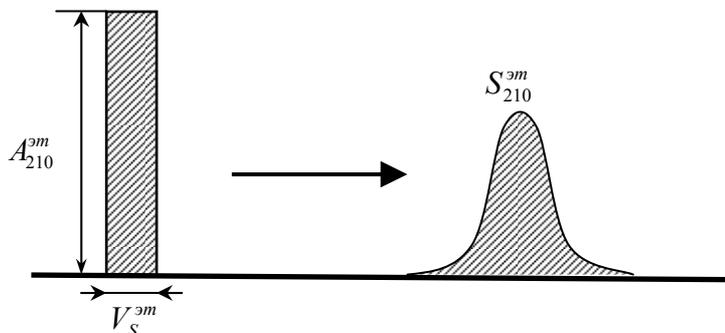


Рис. 10. Схема размывания образца в хроматографической колонке

г) Полученное значение  $A_{210}^{эм}$  для раствора с концентрацией  $c^{эм}$  позволяет вычислить для этого раствора значения поглощений при всех длинах волн по уравнению:

$$A_\lambda^{эм} = A_{210}^{эм} \cdot \frac{A_\lambda}{A_{210}} \quad (34)$$

В Приложении 4 УФ спектры веществ № 1 - 29 приведены в координатах  $\varepsilon_\lambda = f(\lambda)$ .

## 5.2.8 Графическое представление хроматограмм, генерированных для градиентного режима элюирования при многоволновом детектировании

Для иллюстрации возможностей разработанного алгоритма расчёта (генерации) хроматограмм нами были генерированы две хроматограммы в режимах линейного и двухступенчатого кусочно-линейного градиентов при детектировании на восьми длинах волн для нескольких веществ (см. раздел 4.3.5, эксперименты 5 и 6). Эти же вещества были хроматографированы в тех же условиях. Сравнение генерированных и экспериментальных хроматограмм приведено на рис. 11 и 12. Значения вычисленных и экспериментальных хроматографических параметров приведены в таблице 3.

**Таблица 3.** Значения вычисленных и экспериментальных хроматографических параметров веществ.

№	Вещество	Значение	$V_R$ , мкл	$S_{210}$ , е.о.п.*мкл	$w_{1/2}$ , мкл	$\Delta V_r, \%$	$\Delta S, \%$	$\Delta w_{1/2}, \%$
2	Парацетамол <sup>1</sup>	эксп.	362	18,4	21,4	41,2%	26,1%	27,1%
		вычисл.	511	13,6	15,6			
4	Триптофан <sup>1</sup>	эксп.	895	47,7	21,3	3,8%	6,7%	22,5%
		вычисл.	929	44,5	16,5			
5	Дибазол <sup>1</sup>	эксп.	1511	39,4	20,2	4,8%	2,0%	4,0%
		вычисл.	1583	38,6	19,4			
5	Дибазол <sup>2</sup>	эксп.	2046	74,9	18,9	0,7%	3,1%	47,5%
		вычисл.	2032	77,2	9,9			
10	Димедрол <sup>1</sup>	эксп.	2191	24,3	22,7	3,2%	11,1%	4,0%
		вычисл.	2121	21,6	23,6			
15	Бромгексин <sup>2</sup>	эксп.	2404	55,0	20,1	0,5%	0,7%	51,6%
		вычисл.	2416	54,6	9,7			
20	Ди(н-бутил)фталат <sup>2</sup>	эксп.	2876	38,3	19,9	1,1%	8,4%	46,2%
		вычисл.	2909	35,1	10,7			
21	Нафталин <sup>1</sup>	эксп.	2950	92,3	39,6	3,5%	9,3%	14,6%
		вычисл.	2848	100,9	33,8			
25	Пирен <sup>2</sup>	эксп.	2955	33,9	17,5	0,8%	8,8%	36,4%
		вычисл.	2979	30,9	11,1			

<sup>1</sup>Вещество хроматографировали в условиях линейного градиента (см. раздел 4.3.5, эксперимент 5).

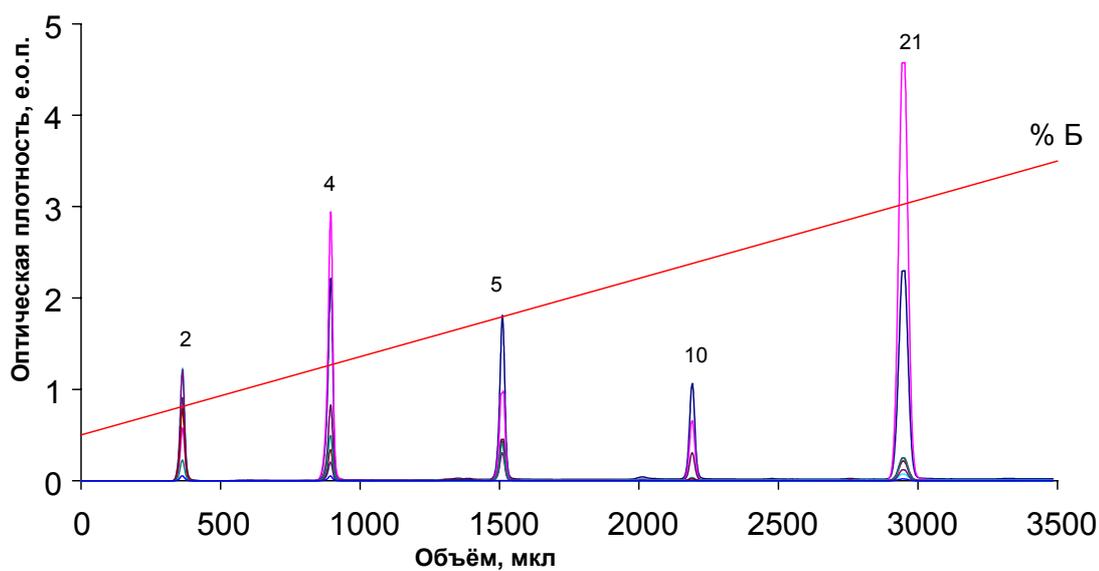
<sup>2</sup>Вещество хроматографировали в условиях кусочно-линейного градиента (см. раздел 4.3.5, эксперимент 6).

Как следует из таблицы 3, погрешность вычисления площадей хроматографических пиков, за исключением пика парацетамола, не превысила 11,1%, что является удовлетворительным результатом. Причина большого различия между вычисленными и экспериментально полученными площадями и объёмами удерживания пика парацетамола нам неясна, и будет изучена в дальнейшем. Погрешность расчёта ширины пиков в среднем составила около 25%. Максимальное отличие расчётной величины от экспериментальной достигло 51,6%. Полученные результаты согласуются с литературными данными [29].

## 5.3 Подход к моделированию метрологических характеристик детектора

Функция детектора заключается в регистрации количества анализируемого вещества, растворённого в подвижной фазе, в виде электрического сигнала [3]. Основными характеристиками детектора являются уровень шума, дрейф нулевой линии, линейный динамический диапазон, постоянная времени [10].

### Экспериментальная хроматограмма при 8 длинах волн



### Экспериментальная хроматограмма при 8 длинах волн

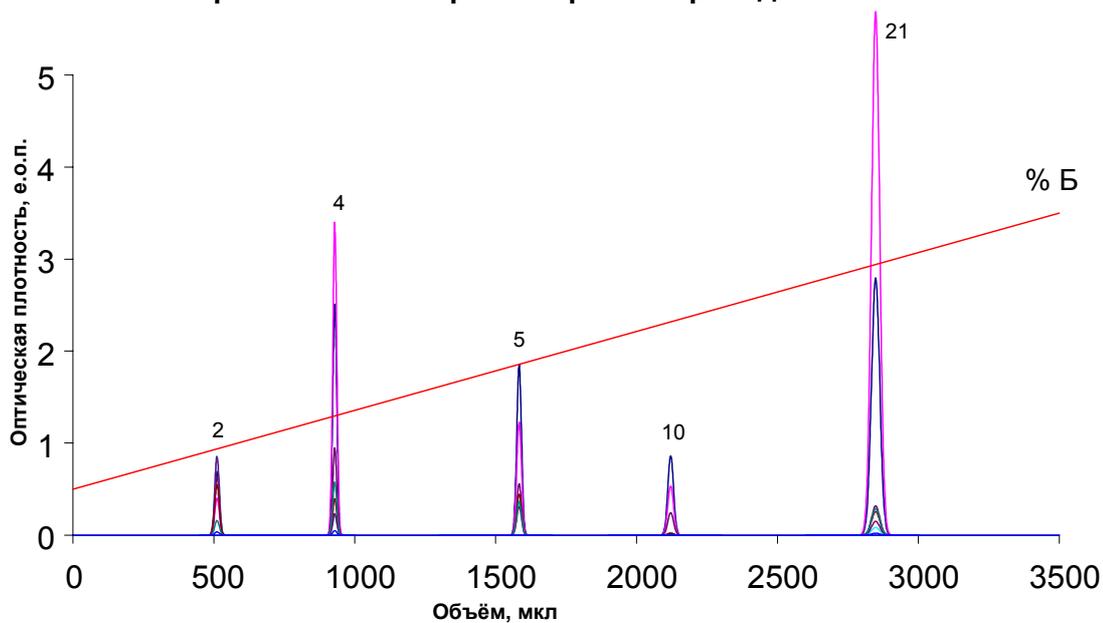
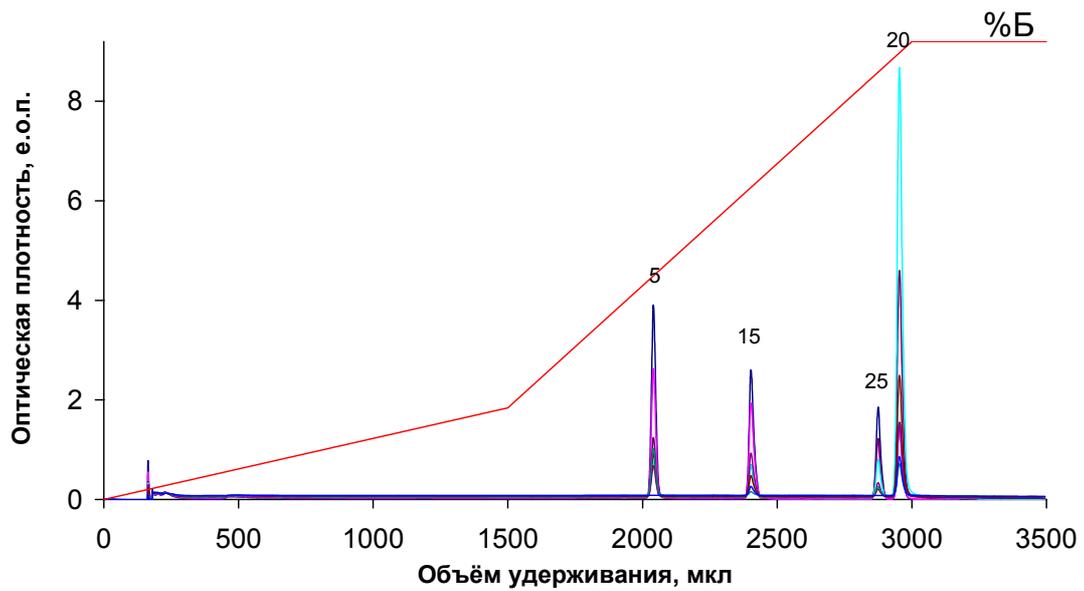


Рис. 11. Сравнение экспериментальной и генерированной хроматограмм смеси веществ №№ 2, 4, 5, 10, 21 для условий эксперимента 5 (см. раздел 4.3.5). Номера пиков соответствуют номерам веществ (см. Приложение 1).

### Экспериментальная 8-волновая хроматограмма



### Расчётная хроматограмма при 8 длинах волн

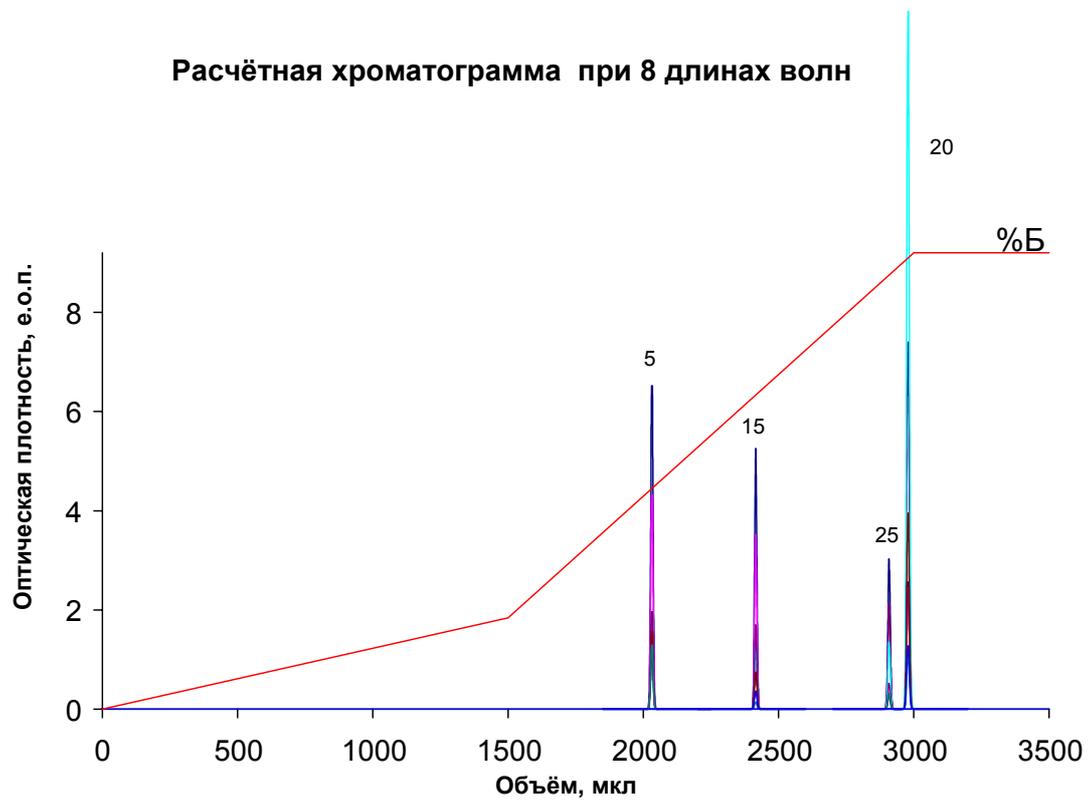


Рис. 12. Сравнение экспериментальной и генерированной хроматограмм смеси веществ №№ 5, 15, 20, 25 для условий эксперимента 6 (см. раздел 4.3.5). Номера пиков соответствуют номерам веществ (см. Приложение 1).

### 5.3.1 Оценка уровня шума

Одним из важнейших параметров любого детектора, определяющих его метрологические характеристики, является уровень шума. В хроматографии именно шумом определяется предел обнаружения: высота пика определяемого вещества должна не менее, чем вдвое превышать уровень шума. Источниками шумов являются АЦП, наводки на соединительные провода, детектор, поток элюента [37]. Уровень шума детектора также зависит от постоянной времени измерения [10]:

$$A_{шум} \sim \tau^{-1/2}, \quad (35)$$

где  $\tau$  - постоянная времени измерения детектора.

Прецизионный УФ детектор, установленный на хроматографе "Альфахром", позволяет проводить регистрацию веществ одновременно при нескольких длинах волн в диапазоне от 190 до 360 нм и в двух режимах – однолучевом (без использования кюветы сравнения) и двухлучевом (с использованием кюветы сравнения). Режим работы детектора, наряду с вышеперечисленными факторами, влияет на уровень шума.

Для установления зависимости уровня шума от длины волны и постоянной времени детектора провели эксперименты, описанные в разделе 4.3.6. Результаты приведены в таблице 4.

Расчёт уровня шума в однолучевом режиме осложнён наложением дрейфа и блуждания нулевой линии и в данной работе не приводится. Использование двухлучевого режима позволяет компенсировать дрейф нулевой линии и длиннопериодный шум.

Из полученных результатов видно, что с увеличением постоянной времени уровень шума уменьшается, что согласуется с соотношением (35). Из рис. 13 видно, что наименьший уровень шума наблюдается при длине волны 210 нм.

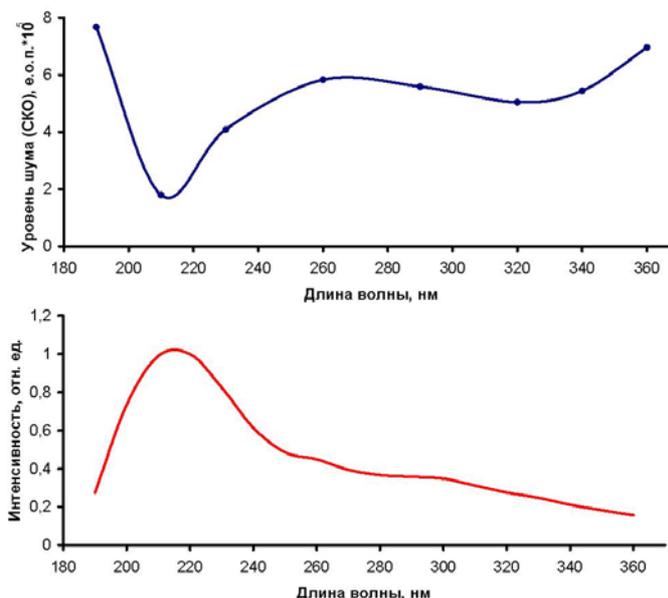


Рис. 13. Сравнение зависимостей уровня шума при постоянной времени детектора 0,34 с и интенсивности света дейтериевой лампы от длины волны.

Полученные данные по уровню шума хорошо согласуются с зависимостью интенсивности падающего света дейтериевой лампы от длины волны (В.П. Шилин, ЗАО "ЭкоНова", г. Новосибирск; данные приведены с разрешения автора): чем меньше света попадает на фотоприемник, тем выше уровень шума.

**Таблица 4.** Уровень шума детектора (СКО) в зависимости от длины волны и постоянной времени измерения.

Постоянная времени, с	Длина волны, нм							
	190	210	230	260	290	320	340	360
0,06	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$7,6 \cdot 10^{-4}$
0,34	$7,7 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$4,1 \cdot 10^{-5}$	$5,8 \cdot 10^{-5}$	$5,6 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$5,4 \cdot 10^{-5}$	$7,0 \cdot 10^{-5}$
2,60	$7,6 \cdot 10^{-5}$	$<1 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-5}$	$<1 \cdot 10^{-5}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$	$<1 \cdot 10^{-5}$	$<1 \cdot 10^{-5}$
20,80	$<1 \cdot 10^{-5}$							

Согласно паспорту хроматографа "Альфахром", уровень шума при длине волны 250 нм при постоянной времени 0,34 с при детектировании в двухлучевом режиме не должен превышать  $1 \cdot 10^{-4}$  е.о.п., что согласуется с полученными данными.

### 5.3.2 Оценка дрейфа нулевой линии

Дрейф нулевой линии – это одностороннее смещение нулевого сигнала детектора за определённое время. Источником дрейфа, помимо химических причин, является нестабильность работы лампы УФ детектора. Она может проявиться, если лампа выработала свой ресурс, либо хроматограф не вышел на режим ("не прогрелся") перед началом работы. Наличие значительного дрейфа затрудняет обработку хроматограмм и свидетельствует о неисправности хроматографа, либо об ошибках, допущенных оператором при подготовке к работе. По этой причине оценка дрейфа нулевой линии представляется нам важной в разработке компьютерного тренажёра "Жидкостный хроматограф".

На рис. 14 представлена зависимость дрейфа нулевой линии от времени, записанная в однолучевом режиме в условиях, указанных в разделе 4.3.6. Аналогичный эксперимент, проведённый в двухлучевом режиме, как и ожидалось, показал отсутствие дрейфа.

Из полученных данных видно, что наибольший дрейф наблюдается при детектировании на длине волны 190 нм и уменьшается с увеличением  $\lambda$ . Со временем дрейф уменьшается, и сигнал детектора выходит на плато. Величины дрейфа и время выхода сигнала на плато представлены в таблице 5. Полученные данные позволяют моделировать многоволновые хроматограммы, близкие к экспериментальным.

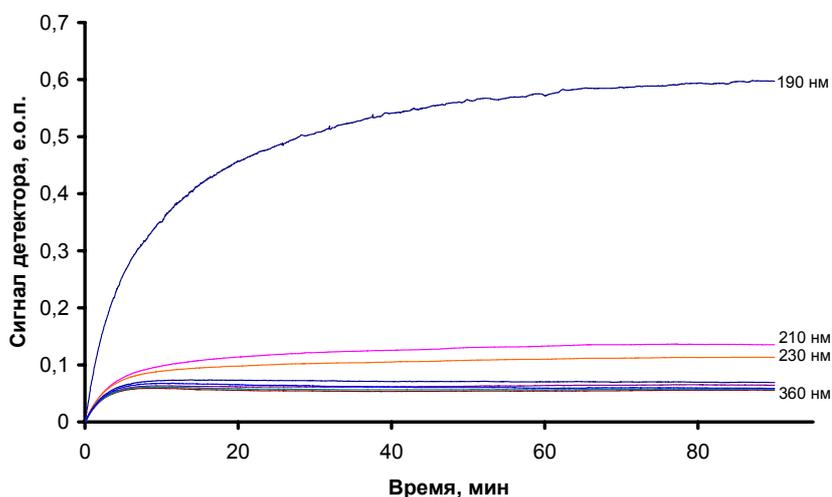


Рис. 14. Дрейф нулевой линии, наблюдаемый при записи сигнала детектора на предварительно не прогретом хроматографе "Альфахром" в однолучевом режиме.

**Таблица 5.** Величина дрейфа и время выхода на плато сигнала детектора при записи сигнала на непрогретом хроматографе "Альфахром" в однолучевом режиме.

Длина волны, нм	Время выхода сигнала на плато, мин	Величина дрейфа, е.о.п.
190	70	0,60
210	30	0,14
230	30	0,11
260	5	0,07
290	5	0,06
320	5	0,06
340	5	0,06
360	5	0,06

### 5.3.3 Исследование диапазона стабильности спектральных отношений

Согласно уравнению (32) (см. раздел 5.2.7), величины спектральных отношений  $\frac{A_{\lambda 1}}{A_{\lambda 2}}$  не зависят от

концентрации раствора вещества-аналита в кювете детектора и, следовательно, от абсолютных значений регистрируемых оптических плотностей. Однако это утверждение справедливо только для значений  $A_{\lambda}$ , лежащих в пределах линейного динамического диапазона детектора, и можно было ожидать, что с ростом оптического поглощения спектральные отношения могут изменяться. Для проверки этого предположения провели экспериментальную оценку стабильности спектральных отношений раствора вещества в условиях, указанных в разделе 4.3.6. В качестве модельного вещества выбрали индигокармин, т.к. он хорошо поглощает в диапазоне от 190 до 360 нм. Результаты эксперимента, а также структурная формула и УФ спектр индигокармина показаны на рис. 15.

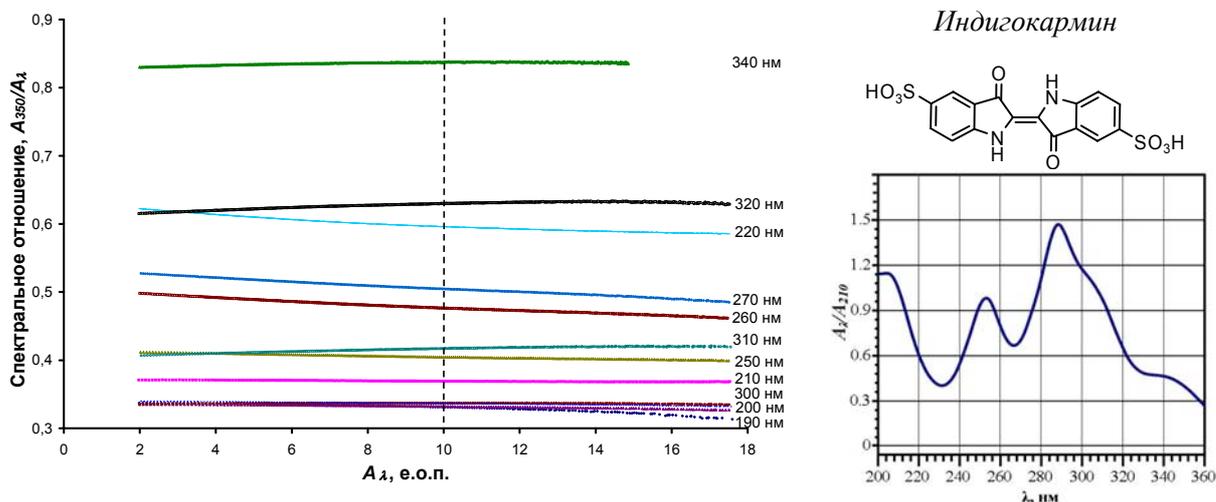


Рис. 15. Зависимость спектральных отношений индигокармина  $\frac{A_{350}}{A_{\lambda}}$

от оптического поглощения.

Изменение спектральных отношений  $\frac{A_{350}}{A_{\lambda}}$  при увеличении оптической плотности от 2 до 18 е.о.п.

составило не более 0,03, что соответствует погрешности расчёта спектральных отношений, обусловленной техническими характеристиками хроматографа. Обычно линейный диапазон детектора хроматографа

"Альфахром" не превышает 10 - 12 е.о.п. Однако, с "новой" дейтериевой лампой, дающей более интенсивное излучение, линейный диапазон может быть расширен до 16 - 18 е.о.п. В связи с этим для тренажёра диапазон стабильности спектральных отношений целесообразно ограничить 10 е.о.п.

#### 5.4 Расчёт давления в гидравлической системе хроматографа

Рабочее давление в жидкостной системе хроматографа зависит от условий проведения анализа. Его максимальная величина ограничена техническими характеристиками прибора, и в случае превышения допустимого давления управляющая программа хроматографа прервёт анализ. Эту особенность важно учесть при разработке компьютерного тренажёра для максимально полной эмуляции хроматографического процесса. В связи с этим исследование зависимости рабочего давления в гидравлической системе от условий проведения ВЭЖХ представляется важной задачей.

В работах [38,39], приведено известное соотношение для расчёта рабочего давления в хроматографической системе:

$$P(F, c, T) = K \cdot \frac{F \cdot \eta(c, T) \cdot l}{d_p^2 \cdot D^2}, \quad (36)$$

где  $\eta(c, T)$  – вязкость элюента,  $l$  и  $D$  – соответственно длина и диаметр колонки,  $d_p$  – диаметр частиц сорбента,  $K$  – коэффициент пропорциональности, зависящий от конкретной хроматографической системы. Однако мы не можем использовать уравнение (36) для расчёта давления напрямую, т.к. нам неизвестна зависимость  $\eta(c, T)$ , и, следовательно, мы не можем вычислить коэффициент  $K$ . Поэтому зависимости  $P(c; F, T)$ , мы определяли экспериментально.

##### 5.4.1 Исследование зависимости давления от скорости потока элюента, состава подвижной фазы и температуры колонки

Эксперименты по исследованию зависимостей давления в хроматографической системе от скорости потока, состава подвижной фазы и температуры колонки проводили в условиях, указанных в разделе 4.3.8. Результаты представлены соответственно на рис. 16, 17 и 18.

Полученных результатов недостаточно для расчёта давления в хроматографической системе, т.к. на выходе из детектора хроматографа "Альфахром" установлен клапан противодействия, увеличивающий общее давление в хроматографической системе на некоторую величину. Он нужен, чтобы предотвращать образование пузырей воздуха в кювете детектора во время хроматографии. Вклад клапана в общее давление в системе необходимо исследовать.

##### 5.4.2 Оценка вклада клапана противодействия в общее давление в системе

Для оценки влияния условий проведения анализа на вклад клапана в общее давление в системе провели ряд экспериментов в условиях, описанных в разделе 4.3.9. Результаты представлены на рис. 19.

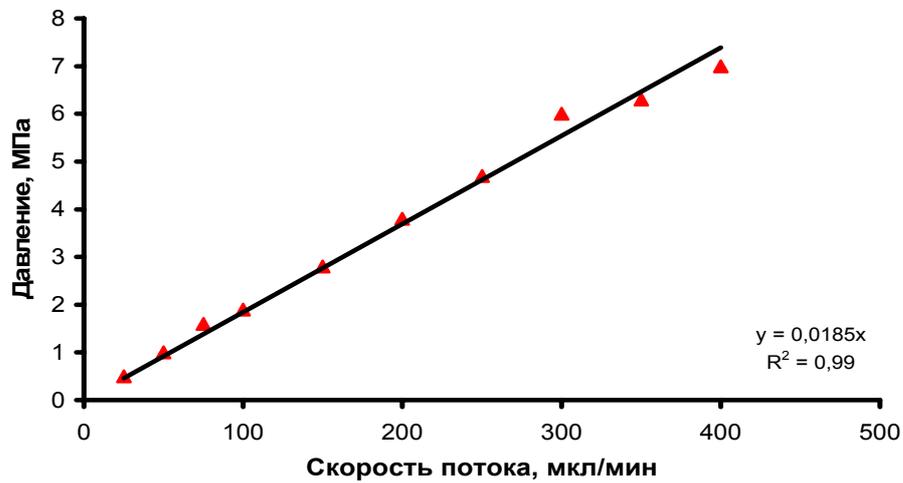


Рис. 16. Зависимость давления в жидкостной системе от скорости потока элюента;  $T=35^{\circ}\text{C}$ .  
Подвижная фаза – вода.

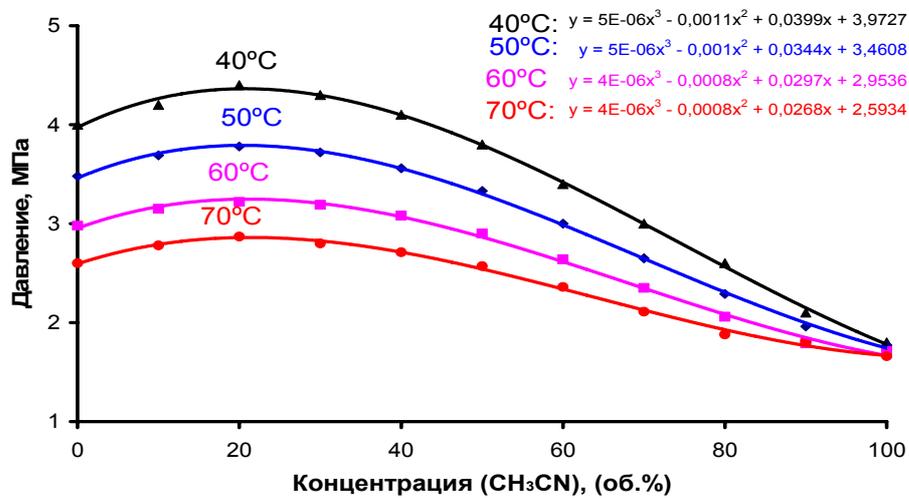


Рис. 17. Зависимость давления в жидкостной системе от состава подвижной фазы при разных температурах;  $F=300$  мкл/мин.

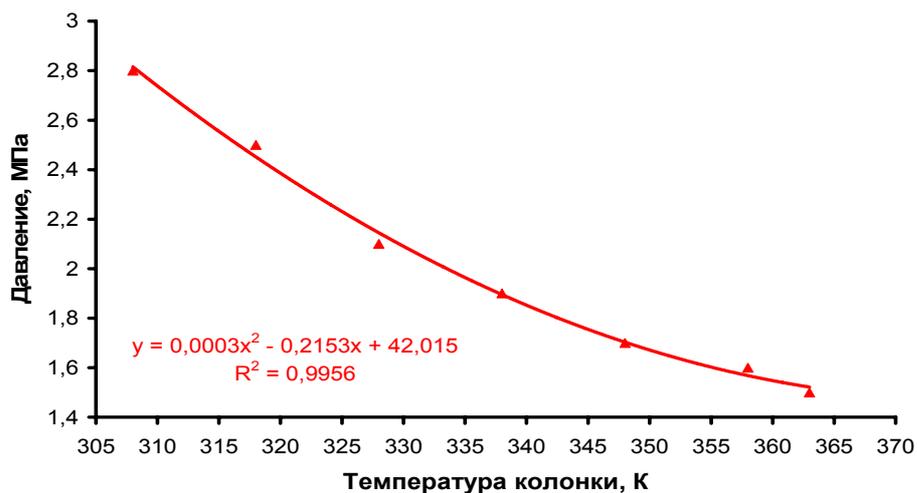


Рис. 18. Зависимость давления в жидкостной системе от температуры;  $F=150$  мкл/мин.  
Подвижная фаза – вода.

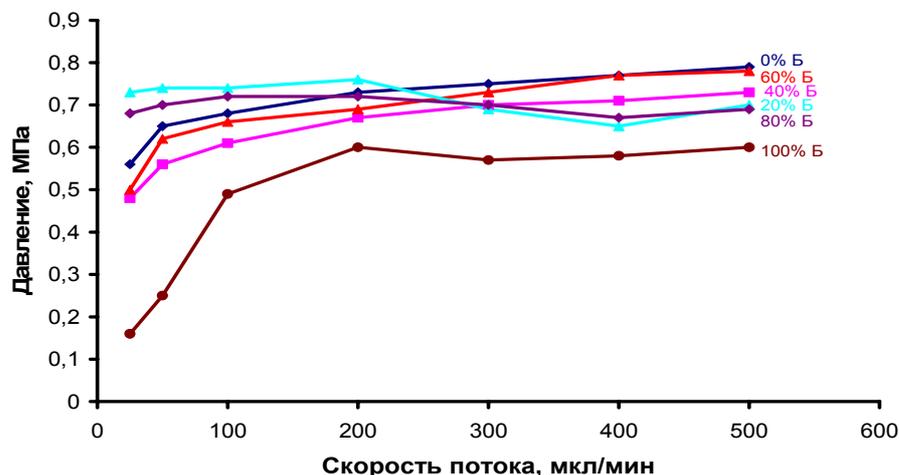


Рис. 19. Зависимость давления в системе от скорости потока элюента. Колонку заменили клапаном противодействия.

Из рис. 19 видно, что вклад клапана в давление в системе при скоростях потока от 100 до 500 мкл/мин составляет 0,5 – 0,7 МПа для подвижной фазы любого состава. При использовании 100% ацетонитрила и скоростях потока до 100 мкл/мин этот вклад составляет порядка 0,2 МПа.

Используя данные, представленные на рис. 16 – 19, рассчитали давление в жидкостной системе хроматографа для условий, описанных в разделе 4.3.5, эксперимент 7. Из данных, показанных в таблице 6, видно, что погрешность расчёта давления не превысила 14%.

**Таблица 6.** Сравнение экспериментальных и вычисленных величин давления

Концентрация CH <sub>3</sub> CN в подвижной фазе, %	P <sub>эксперимент</sub> , МПа (n=2)	P <sub>расчёт</sub> , МПа
20	3,2±0,1	3,3
30	3,3±0,1	3,3
40	3,2±0,1	3,1
50	3,2±0,1	3,0
60	2,9±0,1	2,7
70	2,7±0,1	2,5
80	2,4±0,1	2,3
90	2,2±0,1	1,9

### 5.4.3 Исследование эффекта сжатия элюента

Хроматограф "Альфахром" оборудован двумя шприцевыми насосами. Для процесса элюирования с помощью насосов такого типа характерна сжимаемость подвижной фазы. Сразу после ввода в колонку образца насосы начинают подачу элюента, однако скорость потока устанавливается не сразу, а через некоторое время, зависящее от величины сжатия подвижной фазы. В итоге измеряемый объём удерживания каждого вещества из образца увеличивается согласно следующему уравнению [39]

$$V_R = V_{R \text{ расч}} + \Delta V_{\text{сжатия}}, \quad (37)$$

где  $\Delta V_{\text{сжатия}}$  – изменение объёма подвижной фазы при сжатии.

Величина поправки на сжимаемость  $\Delta V_{сжати́я}$  зависит от рабочего давления в хроматографической системе. Эту зависимость исследовали экспериментально в условиях, указанных в разделе 4.3.10. Результат представлен на рис. 20.

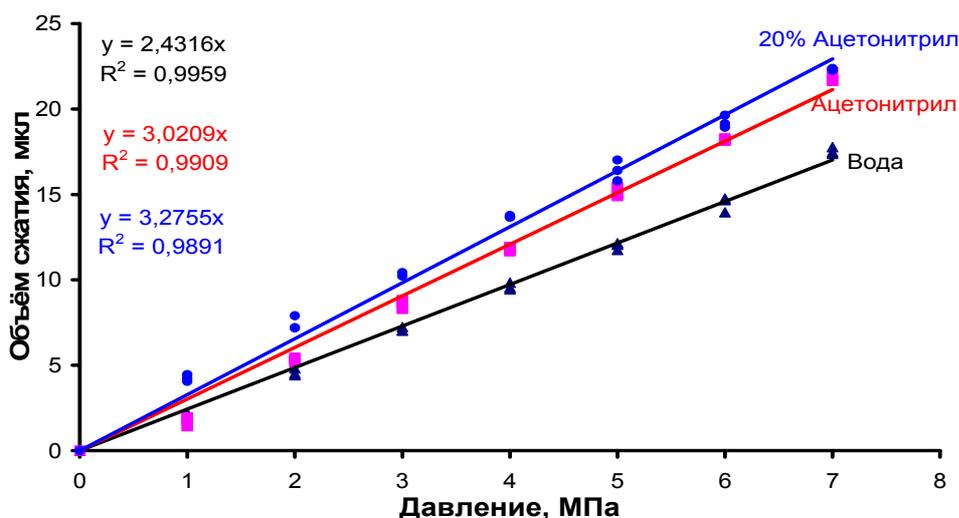


Рис. 20. Зависимость поправки на сжимаемость элюента от давления в системе.

Из графиков, показанных на рис. 20, видно, что оценочная величина сжатия элюента и, соответственно, поправка к объёму удерживания не превышает 25 мкл.

### 5.5 Алгоритм компьютерного моделирования хроматограмм

Результаты, представленные в разделах 5.1 – 5.4, легли в основу алгоритма моделирования хроматограмм. Этот алгоритм включает в себя набор математических операций в строгой последовательности:

1. расчёт объёмов удерживания каждого вещества из образца с помощью "пошагового" алгоритма с учётом зависимости величин  $V_R$  от температуры (см. раздел 5.2.4 и 5.2.5);
2. корректировка всех объёмов удерживания по уравнению (37) (см. раздел 5.4.3);
3. моделирование формы каждого хроматографического пика по уравнению Гаусса с учётом уравнения (20); расчёт площади пика при длине волны 210 нм по уравнению (27);
4. расчёт площадей каждого пика при всех выбранных длинах волн детектирования с помощью спектральных отношений. В результате получаем набор отдельных многоволновых хроматограмм для каждого вещества;
5. суммирование полученных многоволновых хроматограмм. Результат - "идеальная" (без учёта шумов, дрейфа нулевой линии и пр. искажений) многоволновая хроматограмма раствора образца;
6. наложение на хроматограмму дрейфа нулевой линии;
7. наложение на хроматограмму шума при всех длинах волн детектирования;
8. "Отсечение" вершин всех "зашкаленных" пиков высотой более 18 е.о.п.

Разработанный алгоритм позволяет моделировать многоволновые хроматограммы с учётом искажений, обусловленных метрологическими характеристиками хроматографа "Альфахром".

## 5.6 Компьютерный тренажёр "Жидкостный хроматограф"

На основе алгоритма компьютерной эмуляции работы жидкостного хроматографа "Альфахром", показанного на рис. 2, была разработана компьютерная программа-тренажёр "Жидкостный хроматограф" (ООО "ЭрминСофт", г. Новосибирск). Она включает в себя выбор веществ-аналитов из базы данных веществ, имитацию приготовления их растворов и моделирование хроматографического разделения "приготовленных" смесей на колонке Ø 2x75 мм с обращённо-фазовым сорбентом.

Работа в программе реализуется в соответствии со схемой, представленной на рис. 2. Главное окно программы, откуда осуществляется навигация по всем блокам тренажёра, показано в *Приложении 5* на рис.1.

Учащийся имеет возможность проводить виртуальный анализ смесей чистых веществ, природных образцов сложного состава и смесей пептидов. Для подготовки образца из чистых веществ необходимо выбрать соединения из списка (не более 10 одновременно), затем в специальном окне, изображённом в *Приложении 5* на рис. 2, нужно ввести значения навески каждого вещества, выбрать растворитель, мерную колбу и фильтр для образца. Информация о всех веществах из базы данных тренажёра, необходимая для правильного приготовления образца и выбора условий анализа, содержится в т.н. информационных листах. Пример такого листа приведён в *Приложении 6*. Когда виртуальный образец готов, он "помещается" в пробирку автодозатора хроматографа. Подготовка образцов других типов осуществляется аналогичным образом.

Перед началом работы виртуальный хроматограф необходимо включить. Выключатель вместе с анимированной схемой прибора находится в специальном окне, показанном в *Приложении 5* на рис. 3. Анализ начинается с подготовки хроматографа к работе, заключающейся в выполнении набора типовых ручных операций с блоками прибора (см. *Приложение 5*, рис. 4). Далее задаются условия анализа подготовленного образца, и записывается хроматограмма в реальном времени, как показано в *Приложении 5* на рис. 5. Все этапы виртуального анализа выполняются с учётом погрешностей реального оборудования и возможных ошибок учащегося.

### 5.6.1 Моделирование типичных неисправностей хроматографа

В реальном хроматографе возможно возникновение неисправностей, влияющих на правильность результата анализа, и оператор должен уметь их выявлять. Для освоения приёмов диагностики технического состояния хроматографа в тренажёре предусмотрено моделирование большинства неисправностей, влияющих на хроматографический процесс.

Характеристики виртуального прибора можно изменять в специальном окне, представленном в *Приложении 5* на рис. 6. Это окно защищено паролем, и доступ к изменению характеристик прибора имеет только преподаватель. Изменения значений всех параметров учитываются в соответствующих уравнениях при моделировании хроматограмм. Учащийся изначально не знает о техническом состоянии хроматографа, однако имеет возможность проверить правильность его работы, анализируя результаты разделения смеси пяти веществ в стандартных условиях [34]. Если обнаружена неисправность, учащийся сообщает об этом преподавателю, который приводит виртуальный хроматограф в исправное состояние. Если этого не сделать, то задача, поставленная перед учащимся, может быть решена неверно.

Среди возможных неисправностей хроматографа в качестве примера рассмотрим ситуацию, связанную с нарушением работы смесителя. Влияние качества смешивания элюентов на эффективность хроматографической системы исследовали экспериментально в условиях, описанных в разделе 4.3.11. Эффективность оценивали по ширине пика *o*-нитроанилина, элюирующегося последним из компонентов тестовой смеси. Результат показан на рис. 21.

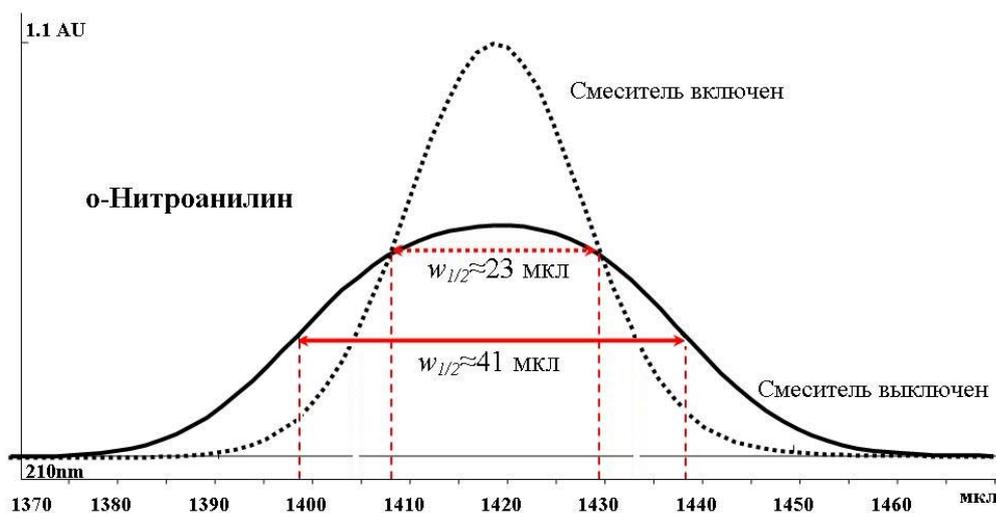


Рис. 21. Ширина пика *o*-нитроанилина, хроматографированного в условиях, регламентированных методикой [34] при включенном и выключенном смесителе.

Ширины пика *o*-нитроанилина на половине высоты при включенном и выключенном смесителе составили соответственно 23 и 41 мкл. Исходя из того, что при включенном смесителе эффективность системы составляет  $\sim 5000$  т.т., по уравнению (20) рассчитали оценочную эффективность при выключенном смесителе. Она составила  $\sim 1600$  т.т. Вышедший из строя смеситель должен дать аналогичный эффект.

#### 5.6.2 Обучение работе на жидкостном хроматографе "Альфахром" с помощью компьютерного тренажёра

Для максимально продуктивного использования компьютерного тренажёра в образовательном процессе необходимо составить учебную программу, охватывающую основные области применения жидкостного хроматографа. В настоящее время ведётся разработка такой программы. В *Приложении 7* представлены примеры учебных задач с решениями.

## 6. ВЫВОДЫ

1. Разработан алгоритм моделирования хроматограмм для градиентной обращённо-фазовой ВЭЖХ с многоволновым УФ детектированием. Погрешности расчёта в среднем составили: для объёмов удерживания 4-6%, для площадей хроматографических пиков 6-8%, для ширин пиков 25%.
2. Для генерирования многоволновых хроматограмм на основании экспериментальных результатов составлена база данных, включающая хроматографические и спектральные параметры 29 веществ для колонки Ø 2x75 мм с сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ и элюирующей системы: элюент А - 0,2М LiClO<sub>4</sub> и 0,005М HClO<sub>4</sub> в воде; элюент Б - ацетонитрил.
3. Для эмуляции работы хроматографа "Альфахром" получены зависимости давления в жидкостной системе хроматографа от температуры колонки, состава подвижной фазы и скорости потока в диапазоне технических характеристик хроматографа. Получены зависимости характеристик детектора (линейного динамического диапазона, уровня шума и дрейфа нулевой линии) от длины волны в диапазоне от 190 до 360 нм.
4. Разработан алгоритм компьютерной эмуляции работы жидкостного хроматографа "Альфахром" с учётом его метрологических характеристик и возможности моделирования большинства неисправностей хроматографа. Предусмотрена проверка правильности работы хроматографа с помощью тестовой смеси согласно известной методике.
5. Разработанные алгоритмы реализованы в первой версии компьютерной программы-тренажёра "Жидкостный хроматограф" (ООО "ЭрминСофт", г. Новосибирск).

## 7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

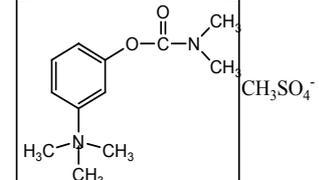
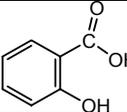
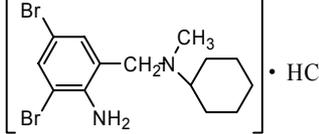
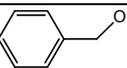
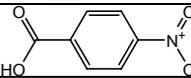
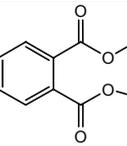
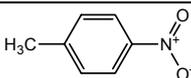
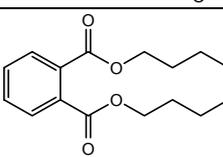
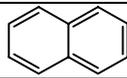
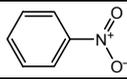
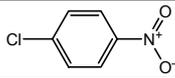
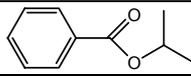
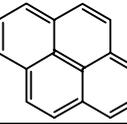
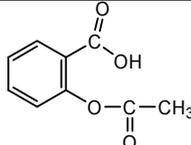
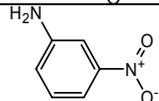
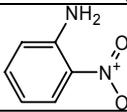
1. Лотшпайх, Ф., Хеншен, А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии / под ред. Хеншен, А. Пер. с английского - М.: Мир, 1988. - 30 - 48 с, 123 с.
2. Хроматография. Основные понятия. Терминология: сб. научно-нормативной терминологии / Рос. акад. наук, Научный совет по хроматографии. - Вып. 114. - М.: 1997. - 47 с.
3. Шатц, В.Д., Сахартова, О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии / под ред. Страдыня, Я.П. – Рига.: Зинатне, 1988. - 201 с.
4. Jandera, P., Churacek, J. Gradient elution in liquid chromatography. I. The influence of the composition of the mobile phase on the capacity ratio (retention volume, band width and resolution) in isocratic elution – theoretical considerations // *J. Chromatogr.*, 1974. - № 91. – P. 207 - 221.
5. Quarry, M.A., Grob, R.L. Band-spacing in reversed-phase high-performance liquid chromatography as a function of solvent strength. A simple and fast alternative to solvent optimization for method development // *J. Chromatogr.*, 1987. - № 384. – P. 163 - 180.
6. Snyder, L.R., Dolan, J.W., Lommen, D.C. DryLab<sup>®</sup> computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development. I. Isocratic elution // *J. Chromatogr.*, 1989. - № 485. – P. 65 - 89.
7. Snyder, L.R., Dolan, J.W., Lommen, D.C. DryLab<sup>®</sup> computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development. II. Gradient elution // *J. Chromatogr.*, 1989. - № 485. – P. 91 - 112.
8. Molnar, I., Snyder, L.R., Dolan, J.W. Reversed-Phase Gradient Elution: How to Get Better Results with Less Work // *LC-GC*, 1998. - № 6. – P. 374 - 387.
9. Стыскин, Е.Л., Ициксон, Л.Б., Брауде, Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. – М.: Химия, 1986. - 149 - 155 с.
10. Scott, R.P.W., Kucera, P. Liquid Chromatography Detectors / Amsterdam: Elsevier, 1977. - 16 - 19 pp, 40 - 56 pp.
11. Baram, G.I., Grachev, M.A., Komarova, N.I., Perelroyzen, M.P. Micro-column liquid chromatography with multi-wavelength photometric detection. I. The OB-4 micro-column liquid chromatograph // *J. Chromatogr.*, 1983. - № 264. – P. 69-90.
12. Horvath, Cs., Melander, W.R. High-performance liquid chromatography. Advances and perspectives. Volume 2 / ed. Horvath, Cs.- New York: Academic Press, 1980. - 204-215 pp.
13. Smith, R.M., Burr, C.M. Retention prediction of analytes in reversed-phase high-performance liquid chromatography based on molecular structure. III. Monosubstituted aliphatic compounds // *J. Chromatogr.*, 1989. - № 481. – P. 71-84.
14. LePree, J.M., Cancino, M.E. Application of the phenomenological model to retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 1998. - № 829. – P. 41-63.
15. Dimov, N., Stoev, St. A new approach to structure-retention relationships // *Acta Chromatogr.*, 1999. - No 9. - P. 55 – 65.
16. Dimov, N. An alternative approach to the calculation of structure-chromatographic retention relationships // *Acta Chromatographica*, 2000. - No 10. – P. 39 - 55.

17. Szepeszy, L. Phenomenological Approach to the Mechanism of Retention in RP HPLC // *Chromatogr.*, 2002. - Vol. 56. - P. S-31 - S-39.
18. Jacab, A., Schubert, G., Prodan, M., Forgacs, E. Study of the Retention Parameters of Barbituric Acid Derivatives in Reversed Phase HPLC by Using Quantitative Structure-Retention Relationships // *Chromatographia*, 2002. - Vol. 56. – P. S-55 - S-59.
19. Jandera, P., Churacek, J. Gradient elution in liquid chromatography. II. Retention characteristics (retention volume, band width, resolution, plate number) in solvent-programmed chromatography - theoretical considerations // *J. Chromatogr.*, 1974. - № 91. – P. 223-235.
20. Jandera, P., Churacek, J. Gradient elution in column liquid chromatography. Theory and practice / ed. Jandera. P. - Amsterdam: Elsevier, 1985. - 59-142 pp.
21. Quarry, M.A., Snyder, L.R. Computer simulation in HPLC method development. Reducing the error of predicted retention times // *J. Chromatogr.*, 1987. - № 10. – P. 1789-1820.
22. Quarry, M.A., Grob, R.L., Snyder, L.R. Measurement and use of retention data from high-performance gradient elution. Correction for “non-ideal” processing originating within column // *J. Chromatogr.*, 1984. - № 285. – P. 19-51.
23. Nikitas, P., Pappa-Louisi, A. New approach to linear gradient elution, used for optimization in reversed-phase liquid chromatography // *J Chromatogr. A*, 2005. - № 1068. – P. 279-287.
24. Quarry, M.A., Grob, R.L., Snyder, L.R. Prediction of precise isocratic retention data from two or more gradient elution runs. Analysis of some associated errors // *Anal. Chem.*, 1986. - № 58. – P. 907-917.
25. Схунмакерс, П. Оптимизация селективности в хроматографии / под ред. Даванкова, В.А. Пер. с англ. – М.: Мир, 1989. - 16 с, 67–68 с.
26. Wolcott, R.G., Dolan, J.W., Snyder, L.R. Computer simulation for the convenient optimization for isocratic reversed-phase liquid chromatographic separations by varying temperature and mobile phase strength // *J. Chromatogr. A*, 2000. - № 869. – P. 3-25.
27. Meyer, V.J. Generation and Investigation of Chromatographic Peaks Using a Spreadsheet Program // *LC-GC*, 1994. - № 10. – P. 590-596.
28. Baram, G.I. Portable liquid chromatograph for mobile laboratories. I. Aims // *J. Chromatogr. A*, 1996. - № 728. – P. 387-399.
29. Heng Liang, Ying Liu. Recursion equations in predicting band width under gradient elution // *J. Chromatogr. A*, 2004. - № 1040. – P. 19-31.
30. Baczek, T., Kaliszan, R. Computer-Assisted Optimization of Reversed-Phase HPLC Isocratic Separations of Neutral Compounds // *LC-GC*, 2001. - № 6. – P. 2-6.
31. Drug Discovery Online. - Canada: Advanced Chemistry Development, Inc, 18.12.2007. - Режим доступа: [http://acdlabs.com/products/chrom\\_lab/lc\\_simulator](http://acdlabs.com/products/chrom_lab/lc_simulator).
32. Прудковский, А.Г., Долгоносов, А.М. IonChrom ver. 1: рабочая программа. – М.: Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского, РАН, 2000. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
33. Microsoft® Office Excel 2003: рабочая программа. – USA: Microsoft Corporation, 1985 – 2003. 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
34. Методика "Хроматографические и спектральные параметры УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии"/ Федеральный

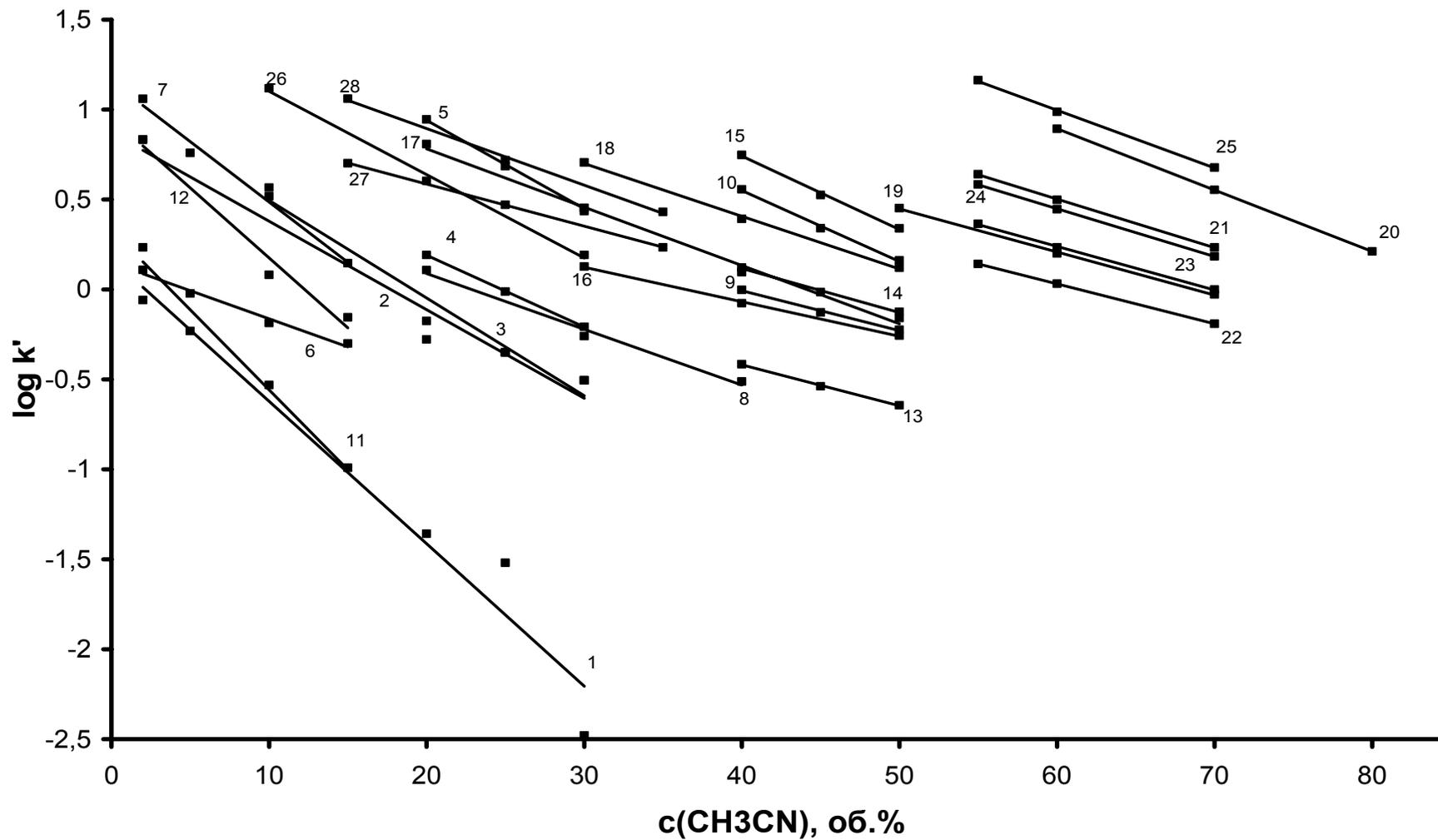
- реестр методик выполнения измерений, применяемых в сферах распространения государственного метеорологического контроля и надзора, № ФР.1.31.2003.00951.
35. Rimmer, C.A., Simmons, C.R., Dorsey, J.G. The measurement and meaning of void volumes in reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.*, 2002. - № 965. – P. 219 – 232.
  36. Краткий справочник по химии / Сост. Гороновский, И.Т., Назаренко, Ю.П., Некряч, Е.Ф. / под ред. Куриленко, О.Д. - 3 изд., доп. - Киев: Наукова Думка, 1965. - 506 с.
  37. Каламбет, Ю.А., Михайлова, К.В. Оценка величины шума и её использование при обработке хроматографического сигнала // *Хроматография*, 2002. - № 1(1). – С. 32 – 35.
  38. Halasz, I., Endeke, R., Asshauer, J. Ultimate Limits in High-Performance Liquid Chromatography // *J. Chromatogr.*, 1975. - № 112. – P. 37-60.
  39. Барам, Г.И. Развитие метода микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии и его применение для решения комплексных аналитических задач: Дис. док. хим. наук. – Иркутск: Лимнологический институт СО РАН, 1997. – 14 – 18 с.
  40. Halasz, I., Schmidt, H., Vogel, P. Particle Size, Pressure and Analysis Time in Routine High-Performance Liquid Chromatography // *J. Chromatogr.*, 1976. - № 126. – P. 19-33.
  41. Toxicology Data Network. - USA: United States National Laboratory of Medicine, 1993 – 2008. – Режим доступа: <http://toxnet.nlm.nih.gov>.
  42. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. – Харьков: Торсинг, 1998. – Т. 1. – 117 – 118 с.

Вещества-аналиты для компьютерного тренажёра  
"Жидкостный хроматограф"

№	Вещество	Химическое название	Структурная формула
1	Уридин	3-β-D-рибофуранозилурацил	
2	Парацетамол	4-Ацетиминофенол	
3	Кофеин	1,3,7-триметилксантин	
4	Триптофан	α-Амино-3-индолилпропионовая кислота	
5	Дибазол	2-Бензилбензимидазола гидрохлорид	
6	Стрептоцид	4-Аминобензолсульфамид	
7	<i>m</i> -Гидроксibenзойная кислота	4-Гидроксibenзойная кислота	
8	Амидопирин	1-Фенил-2,3-диметил-4-метиламинопиразолон-5	
9	Бензойная кислота	Бензолкарбоновая кислота	
10	Димедрол	β-Диметиламиноэтилового эфира бензгидрола гидрохлорид	
11	Рибоксин	9-β-D-Рибофуранозилгипоксантин	
12	Сахарин	2-Бензойной кислоты сульфимид (натриевая соль)	

№	Вещество	Химическое название	Структурная формула
13	Прозерин	<i>N</i> -(3-диметилкарбамоилоксифенил)-триметиламмоний метилсульфат	
14	Салициловая кислота	2-Оксибензойная кислота	
15	Бромгексин	<i>N</i> -(2-амино-3,5-дибромбензил)- <i>N</i> -метилциклогексиламина гидрохлорид	
16	Бензиловый спирт	Фенилметанол	
17	<i>n</i> -Нитробензойная кислота	4-Нитробензойная кислота	
18	Диметилфталат	<i>o</i> -Фталевой кислоты диметиловый эфир	
19	<i>n</i> -Нитротолуол	1-Метил-4-нитробензол	
20	Ди( <i>n</i> -бутил)фталат	<i>o</i> -Фталевой кислоты <i>n</i> -бутиловый эфир	
21	Нафталин	Нафталин	
22	Нитробензол	Нитробензол	
23	<i>n</i> -Нитрохлорбензол	1-Хлор-4-нитробензол	
24	Изопропилбензоат	<i>o</i> -Фталевой кислоты изопропиловый эфир	
25	Пирен	Пирен	
26	Ацетилсалициловая кислота	2-Ацетоксибензойная кислота	
27	<i>m</i> -Нитроанилин	1-Амино-3-нитробензол	
28	<i>o</i> -Нитроанилин	1-Амино-2-нитробензол	
29	Бромид калия	Бромид калия	KBr

Зависимости логарифма коэффициента ёмкости от состава подвижной фазы для веществ № 1-28.  
 Номера графиков соответствуют номерам веществ в *Приложении 1*.

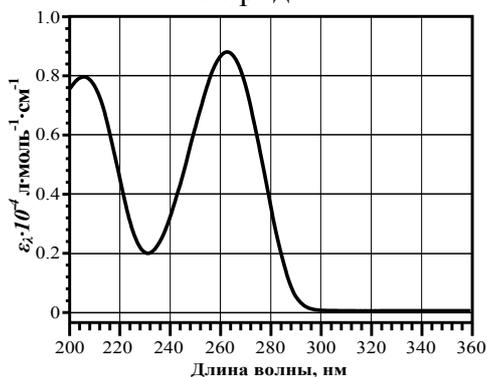


Значения констант  $k_0'$ ,  $n$  и  $S_0$  для исследованных веществ

№	Вещество	$k_0'$	$n$	$S_{0(210\text{нм})}$ , е.о.п. *мл/мг
1	Уридин	1,91	0,084	36,4
2	Парацетамол	7,00	0,048	34,0
3	Кофеин	10,94	0,054	121,2
4	Триптофан	24,93	0,056	111,2
5	Дибазол	83,64	0,049	96,5
6	Стрептоцид	1,60	0,036	66,4
7	<i>n</i> -Гидроксibenзойная кислота	14,39	0,067	86,6
8	Амидопирин	17,46	0,046	40,4
9	Benзойная кислота	25,01	0,034	25,4
10	Димедрол	134,87	0,040	54,1
11	Рибоксин	3,58	0,109	39,9
12	Сахарин	6,14	0,068	110,6
13	Прозерин	21,72	0,041	26,2
14	Салициловая кислота	30,45	0,033	129,1
15	Бромгексин	237,14	0,041	68,2
16	Benзиловый спирт	11,03	0,027	60,5
17	<i>n</i> -Нитробензойная кислота	26,88	0,032	28,9
18	Диметилфталат	37,79	0,029	43,4
19	<i>n</i> -Нитротолуол	85,09	0,029	41,4
20	Ди( <i>n</i> -бутил)фталат	869,16	0,034	43,9
21	Нафталин	133,44	0,027	252,2
22	Нитробензол	35,97	0,025	48,2
23	1-Хлор-4-нитробензол	97,63	0,029	35,7
24	Изопропилбензоат	111,30	0,027	17,3
25	Пирен	841,98	0,032	38,6
26	Ацетилсалициловая кислота	36,31	0,046	38,6
27	<i>m</i> -Нитроанилин	11,30	0,023	41,6
28	<i>o</i> -Нитроанилин	33,34	0,032	58,6
29	Бромид калия	0	-	22,0

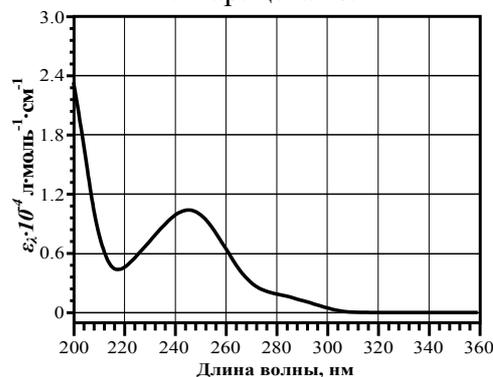
УФ спектры веществ-аналитов в координатах  $\varepsilon_{\lambda} = f(\lambda)$

1. Уридин



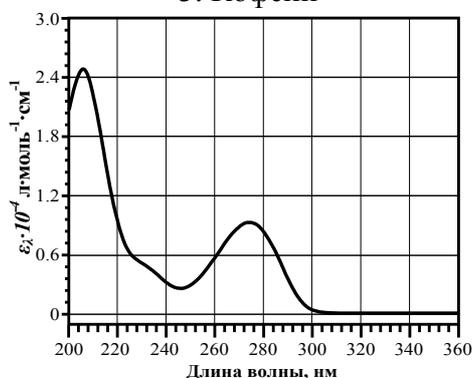
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=100:0

2. Парацетамол



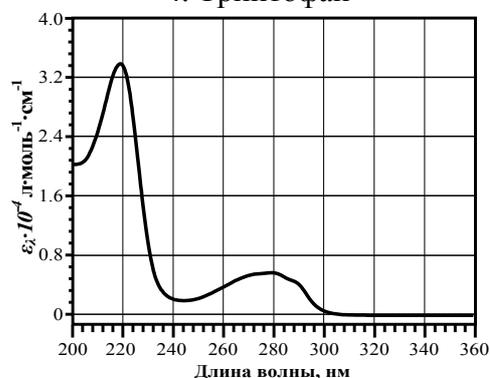
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=90:10

3. Кофеин



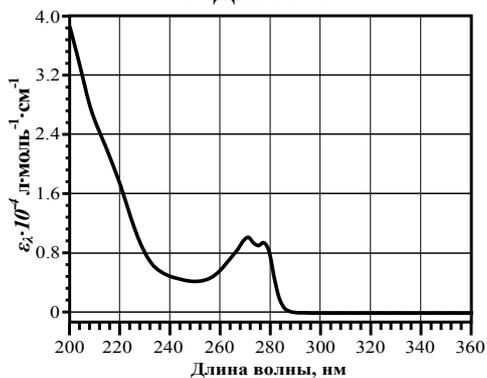
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=90:10

4. Триптофан



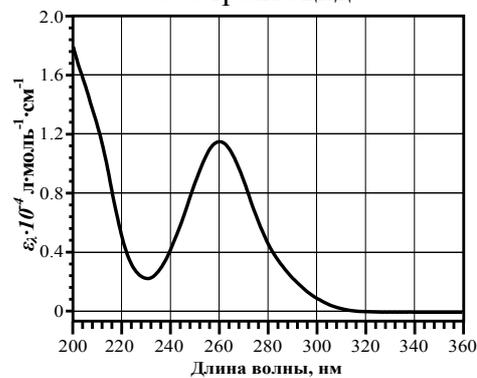
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=85:15

5. Дибазол



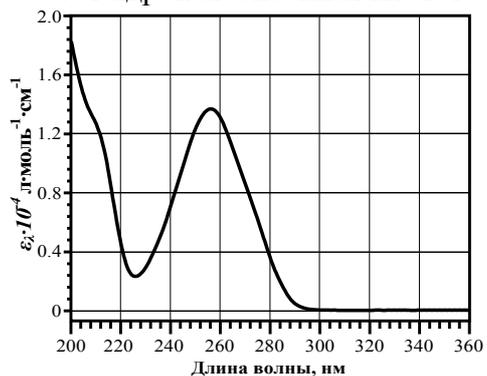
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=70:30

6. Стрептоцид



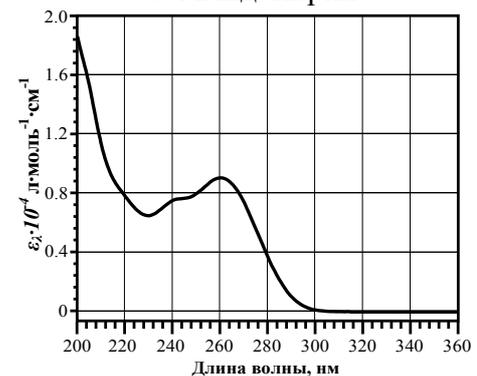
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=95:5

7. *n*-Гидроксибензойная кислота



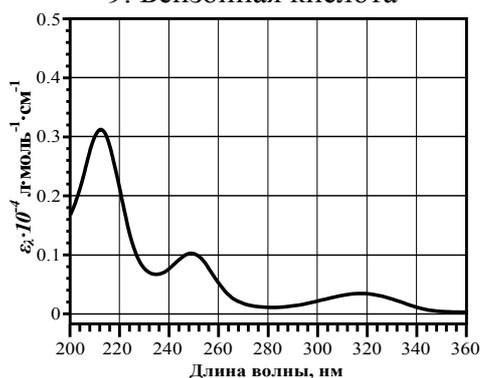
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=85:15

8. Амидопирин



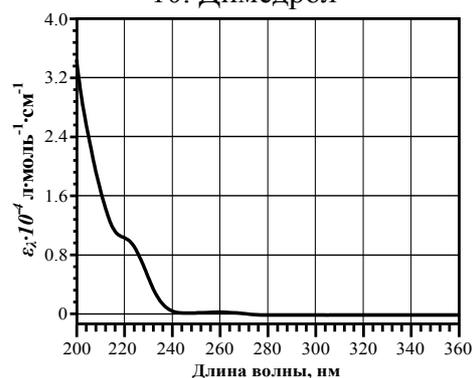
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=85:15

9. Бензойная кислота



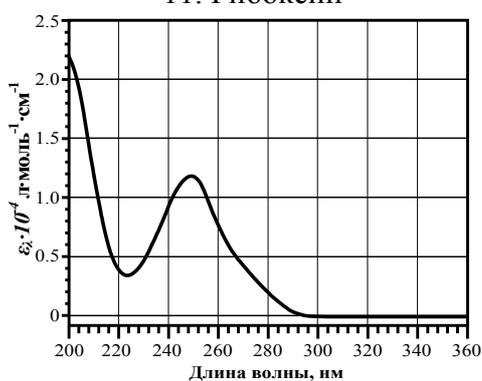
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=80:20

10. Димедрол



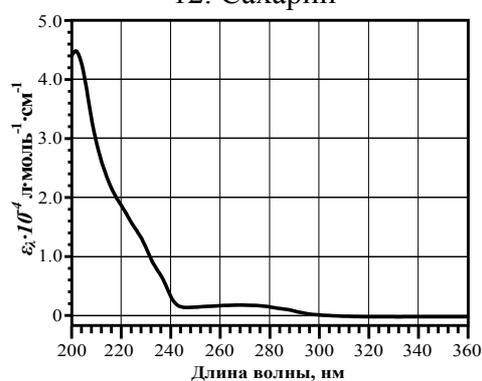
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=60:40

11. Рибоксин



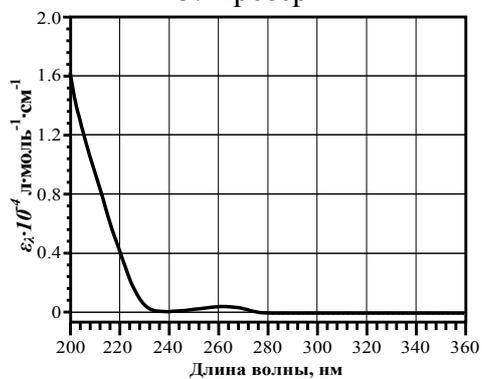
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=95:5

12. Сахарин



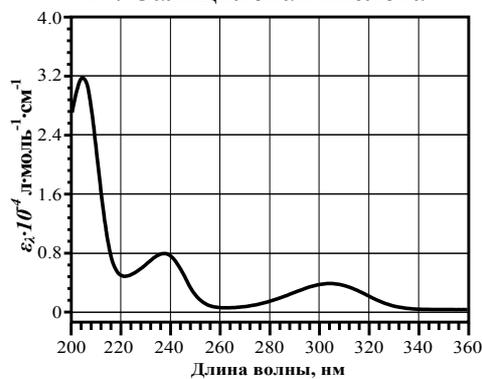
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=90:10

13. Прозерин



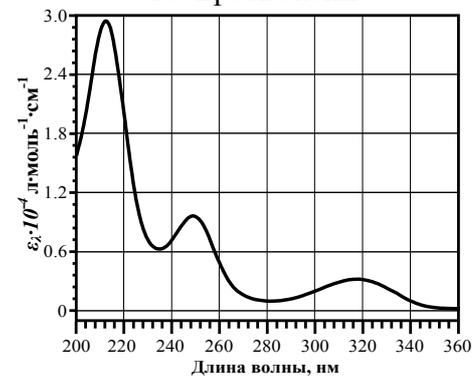
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=85:15

14. Салициловая кислота



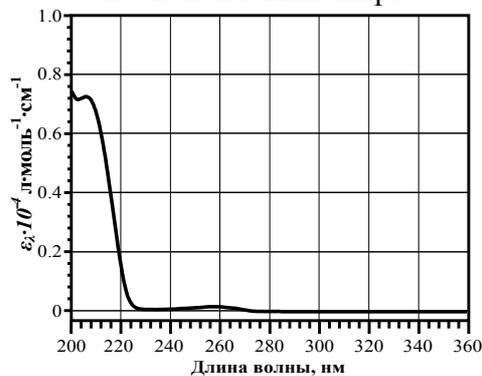
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=75:25

15. Бромгексин



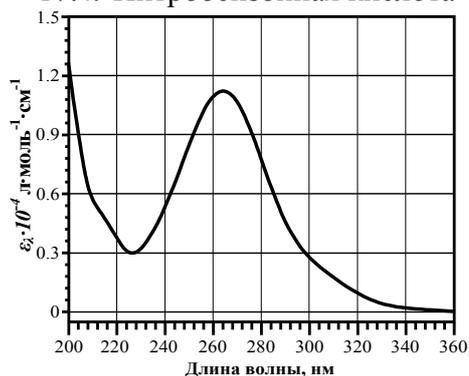
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=55:45

16. Бензиловый спирт



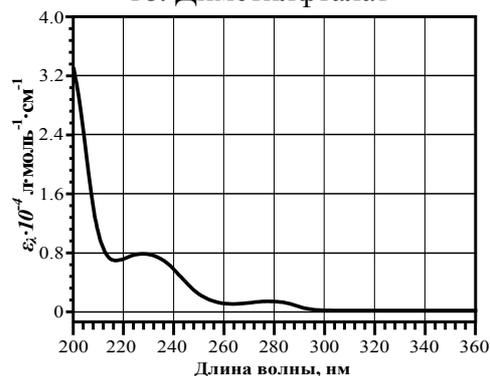
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=80:20

17. *n*-Нитробензойная кислота



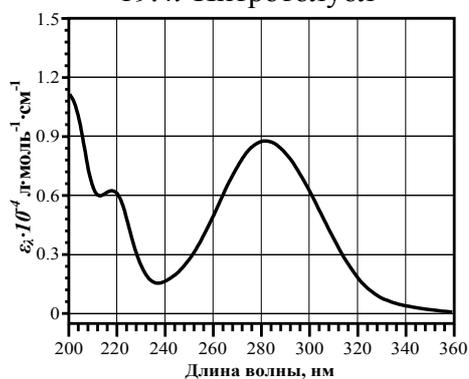
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=70:30

18. Диметилфталат



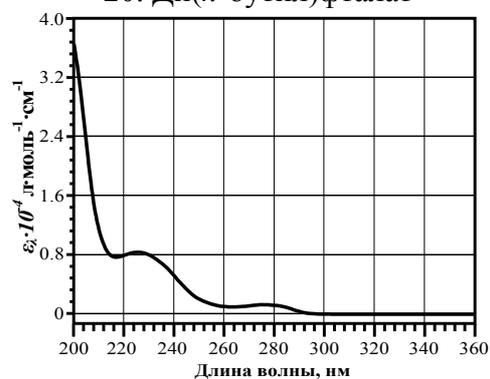
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=65:35

19. *n*-Нитротолуол



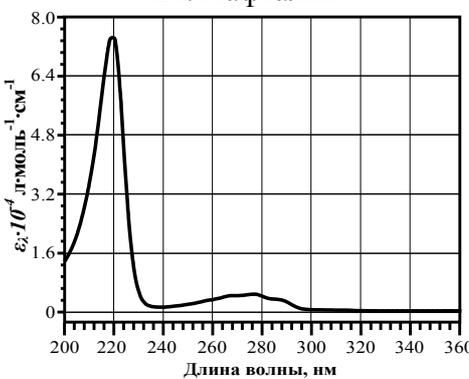
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=55:45

20. Ди(*n*-бутил)фталат



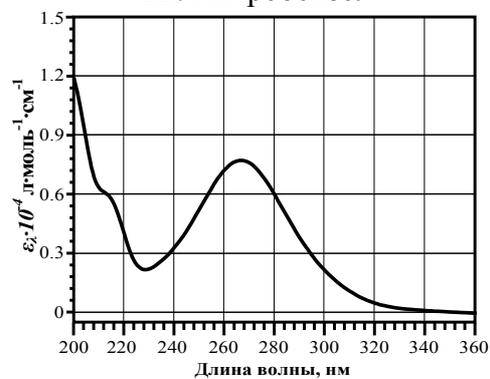
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=30:70

21. Нафталин



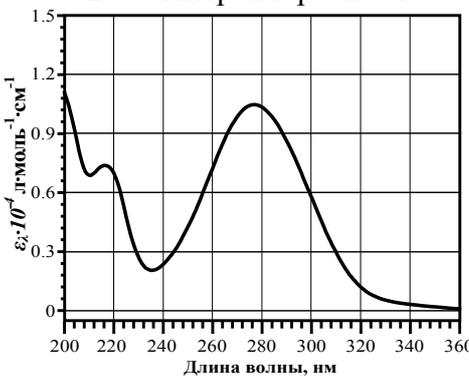
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=40:60

22. Нитробензол



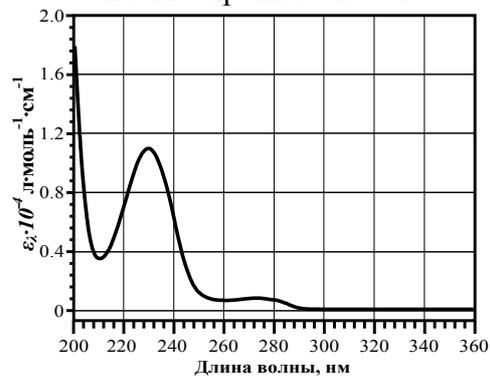
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=65:35

23. *n*-Нитрохлорбензол



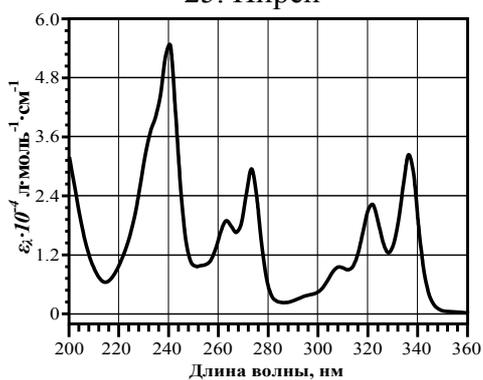
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=55:45

24. Изопропилбензоат



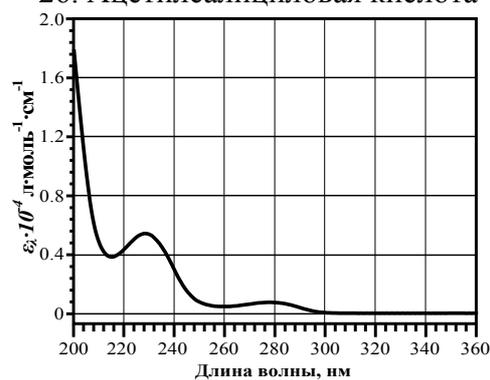
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=40:60

25. Пирен



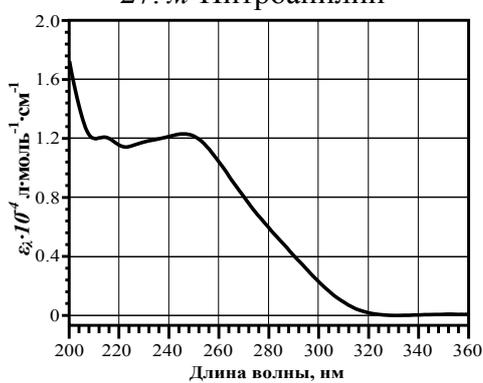
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=25:75

26. Ацетилсалициловая кислота



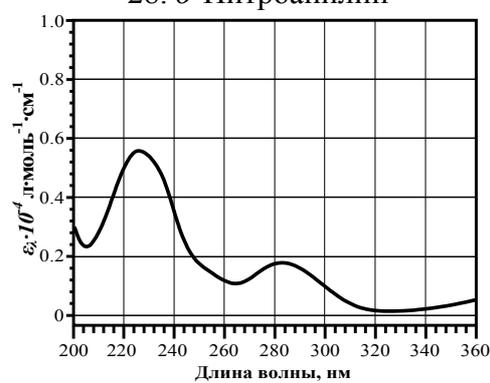
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=75:25

27. м-Нитроанилин



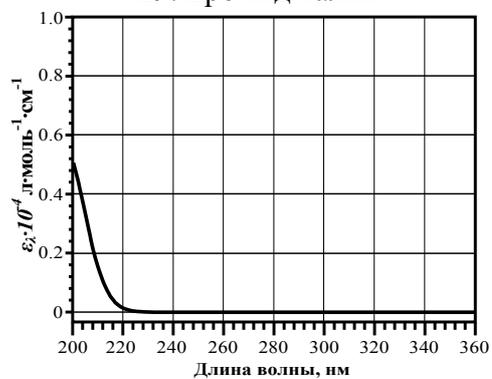
Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=75:25

28. о-Нитроанилин



Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=70:30

29. Бромид калия



Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=95:5

## Интерфейс компьютерного тренажёра "Жидкостный хроматограф"

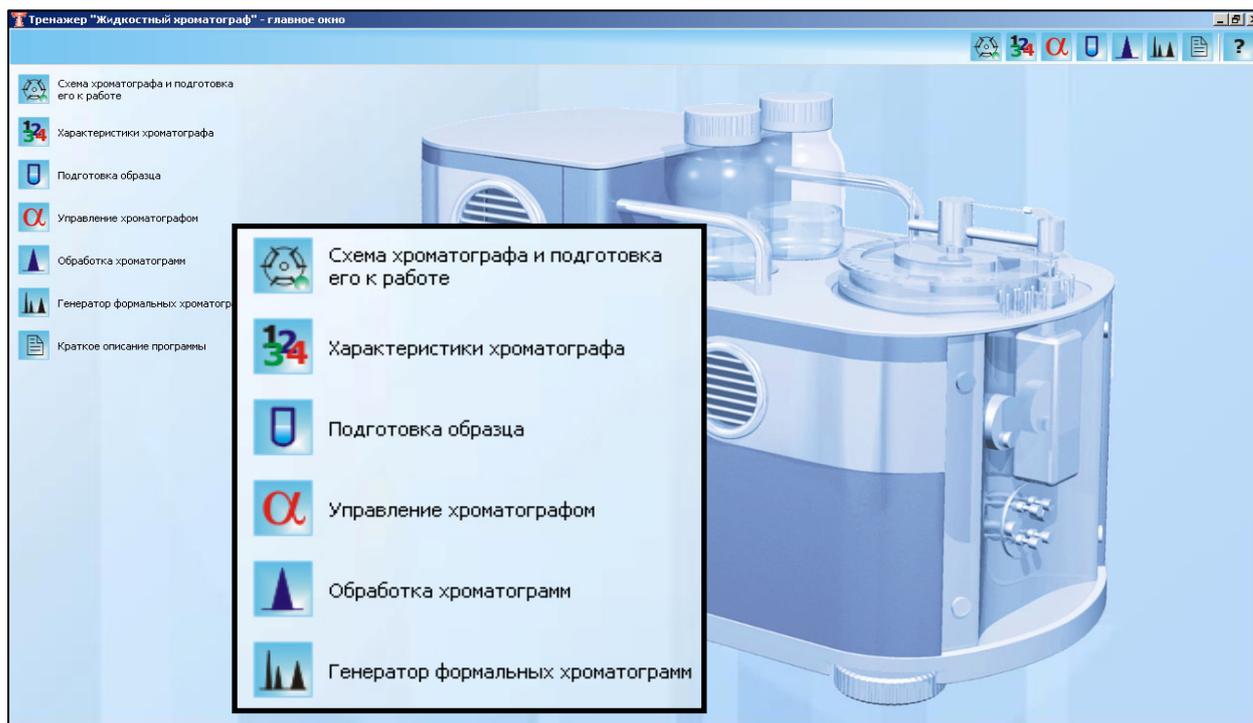


Рис. 1. Главное окно программы, из которого осуществляется навигация по всем блокам тренажёра.

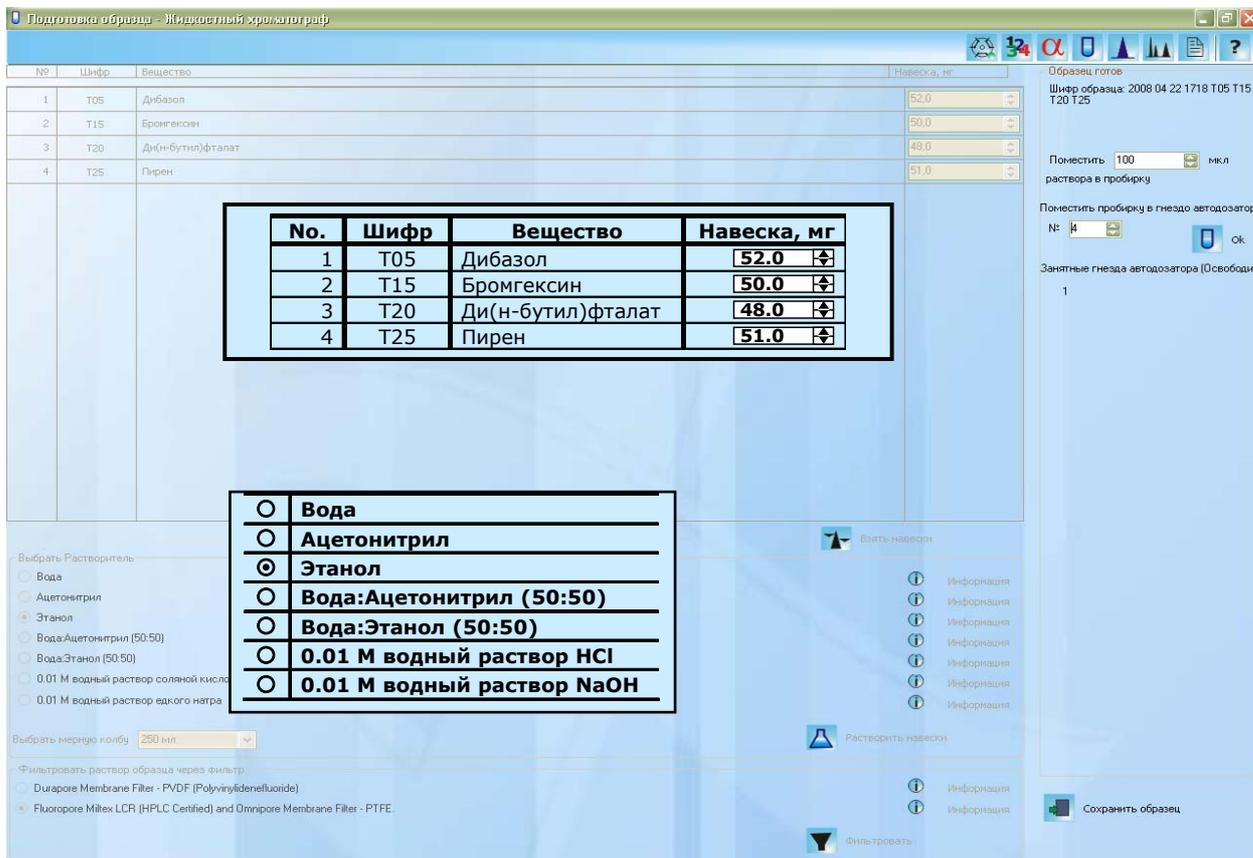


Рис. 2. Окно подготовки образца. Для иллюстрации выбрано четыре вещества из списка. Таблицы со списками веществ и растворителей для наглядности увеличены.

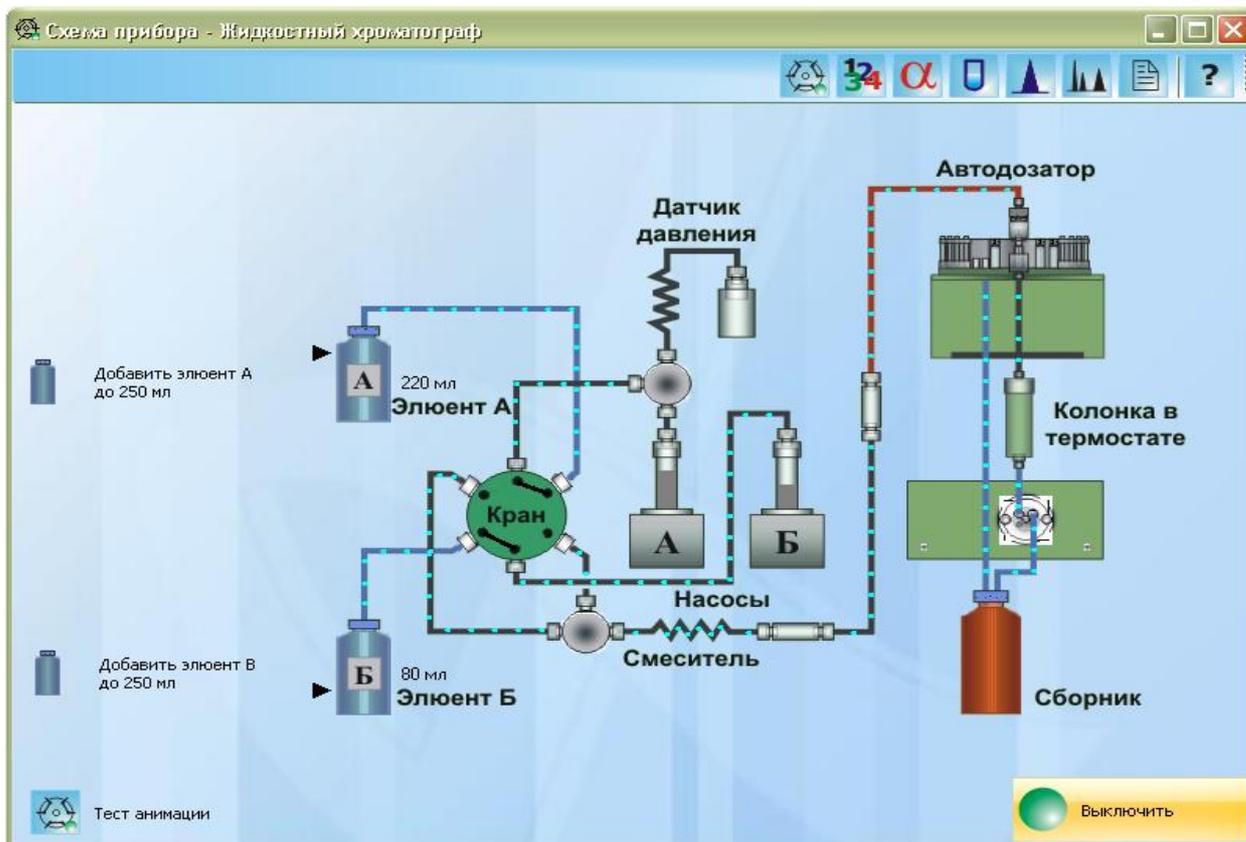


Рис. 3. Анимированная схема хроматографа "Альфахром"

Альфахром - [DATA/test2003/2008-04-17(14.05.37).detector]

Операции с блоками | Анализ | Метод | Серия экспериментов | Сведения | Напечатать | Хромотографический файл | Текущая операция | Анализ | Закрывать все окна | Сигурное отображение

Подготовка заданий | Управление окнами

### Промывка колонки

Колонка № 123 диаметр 2 мм, длина 75 мм, адсорбент ProntoSIL-120-5-C18 AQ размер частиц 5

Элюент А [4 M LiClO4-0.2 M HClO4]:H2O=1:19

Элюент Б Ацетонитрил

Комментарий Вода

промыть насосы 3 раза по 500 нкл Термостат  включить на температуру 35 °C

Подготовка объем 500 нкл Детектор рабочая кювета верхняя постоянная времени

поток 100 нкл/мин метод измерения двухлучевой

элюент 50 %B длины волн, нм 210 220 230 240 250 260 280 300

### Термостат колонки

температура 35 °C

### Автодозатор

объем промывки 40 мкл

скорость потока 400 мкл/мин

элюент 100 %B

### Жидкостная система:

выбрать насосы А и Б

- 
- 
- 
- 
- 

### Регистрация данных детектора

рабочая кювета верхняя постоянная времени 0.17

метод измерения однолучевой

длины волн, нм 210 360

Рис. 4. Окно управления всеми блоками хроматографа.

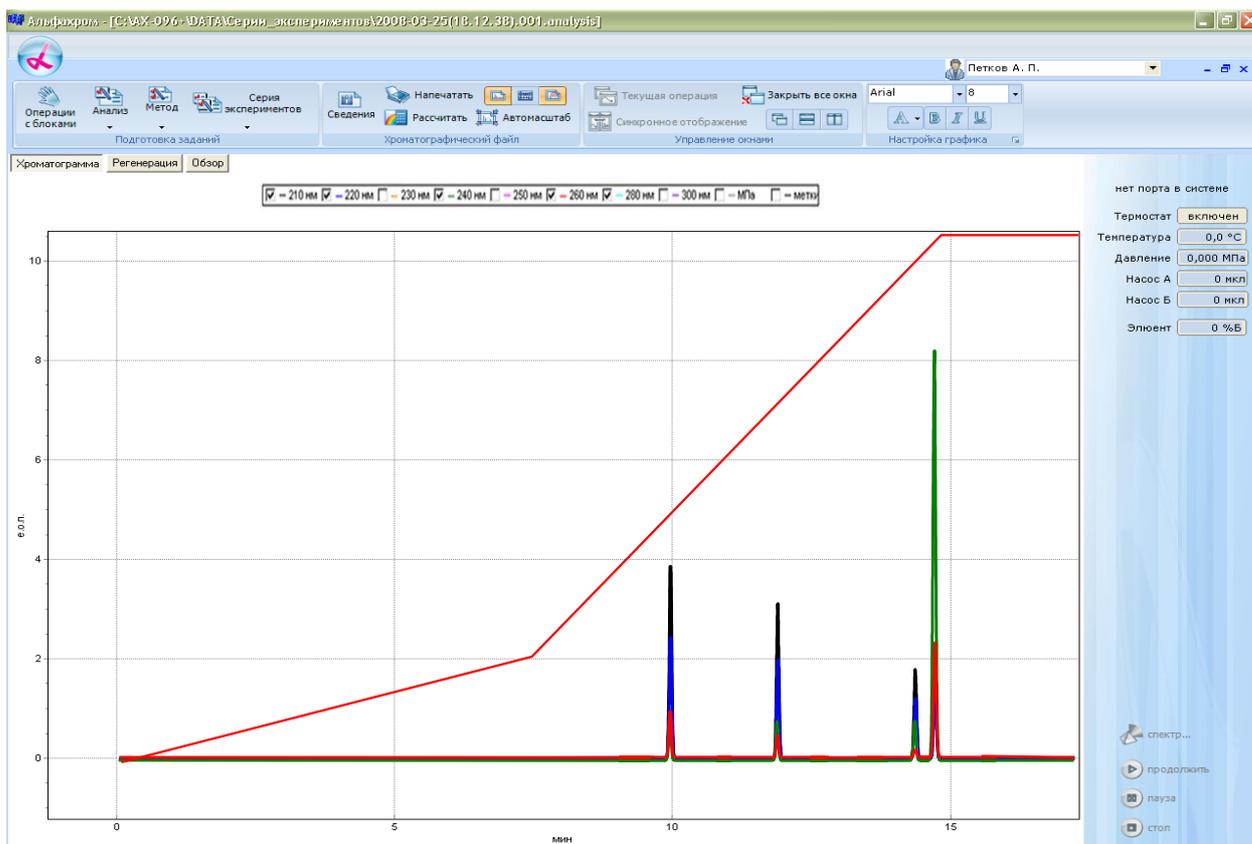


Рис. 5. Окно анализа образца. Для иллюстрации показана хроматограмма веществ: дибазол, бромгексин, ди(*n*-бутил)фталат, пирен (в порядке возрастания объёмов удерживания).

Характеристики	Норма	Значения
Шум детектора при $\lambda=260\text{нм}$ ( $\tau=0,34\text{сек}$ ), е.о.п.	0,0001	0,00010
Погрешность установки $\lambda$ , нм	0,5	0,5
Воспроизводимость установки $\lambda$ , нм	0,01	0,01
Герметичность (Р через 30 сек при $P_0=5\text{ МПа}$ ), МПа	0,5	0,5
Погрешность F (при $F=100\text{ мкл/мин}$ ), мкл/мин	1	1
Погрешность термостатирования колонки, °C	0,1	0,1
Отклонение значения pH элюента А, ед. pH	0,1	0,1
Эффективность колонки для $V_R=2000\text{ мкл, т.т.}$	6000	6000
Эффективность колонки для $V_R=150\text{ мкл, т.т.}$	3000	3000
Ассиметрия пика на уровне 0,1h	1,00	1,00
Погрешность дозирования пробы, мкл	0,02	0,02
Смеситель работает нормально	Да	Да

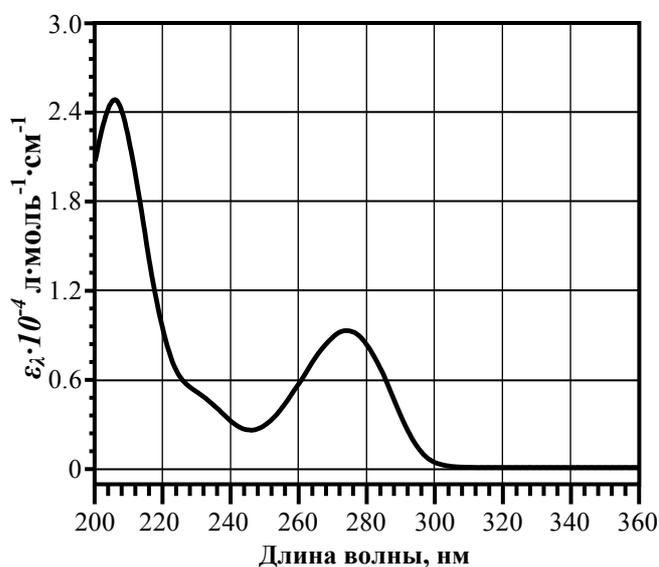
Рис. 6. Окно изменения технических характеристик хроматографа. Таблица с характеристиками для наглядности увеличена.

## Образец информационного листа

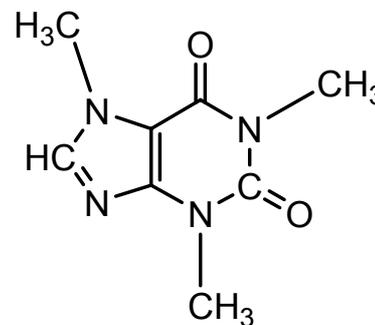
**Кофеин****Свойства**

Синонимы:	1,3,7-триметилксантин, метилтеобромин
Брутто-формула:	$C_{12}H_{19}N_2O_2$
Мол. масса:	194.19
CAS-Но.:	58-08-2
Цвет, форма, запах:	Белые призматические кристаллы. Без запаха.
Растворимость:	1 г в 46 мл воды, 5,5 мл воды при 80°C, 1,5 мл кипящей воды, 66 мл этанола, 22 мл этанола при 60°C, 50 мл ацетона, 5,5 мл хлороформа, 530 мл эфира, 100 мл бензола, 22 мл кипящего бензола [Toxnet]
$pK_a$ :	10,4 (40°C) [Toxnet]
$\log P$ :	-0,07 [Toxnet]
$T_{пл}$ :	238°C
$T_{кип}$ :	178°C (сублимация) [Toxnet]
Применение:	Применяется в медицине, входит в состав многих пищевых продуктов. Высшие дозы для взрослых внутрь: разовая 0,3 г, суточная 1 г. [42]

*Гиперссылка на базу данных "Toxnet" [41]*



Растворитель: [0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.005 М HClO<sub>4</sub>]:[CH<sub>3</sub>CN]=90:10



Смотреть сведения о безопасности>>

*Гиперссылка на информационный лист, содержащий данные о токсичности и технике безопасности при работе с веществами*

## Примеры задач, решаемых с использованием компьютерного тренажёра "Жидкостный хроматограф"

Перед решением задач необходимо подготовить виртуальный хроматограф к работе и проверить правильность работы всех узлов.

### Подготовка хроматографа к работе

В окне "Схема прибора" добавить элюенты в банки до 250 мл; включить хроматограф. Перейти к управлению хроматографом. Провести типовую процедуру подготовки прибора к работе: включить термостат и установить температуру 40°C; трижды сменить растворители в насосах; проверить герметичность системы; промыть инжектор; промыть колонку ацетонитрилом (~1000 мкл). Перейти к подготовке образца. Загрузить из коллекции образец "Тестовая смесь", "поместить" 50 мкл образца в пробирку, "установить" пробирку в гнездо № 1 автодозатора. Перейти к выбору условий разделения. Загрузить метод "Тест БД-2003" [34] и начать анализ. После завершения анализа экспортировать вторую хроматограмму серии в обрабатывающую программу "Мультихром-СПЕКТР", сформировать "Отчёт по валидации". В случае обнаружения неисправности сообщить преподавателю. Если все узлы хроматографа исправны, перейти к решению задач.

### **Задача 1а**

Определить содержание всех компонентов лекарственного средства "Цитрамон-П" с применением базы данных "ВЭЖХ-УФ" [34]. Состав таблетки "Цитрамон-П": 180 мг парацетамола, 30 мг кофеина и 240 мг ацетилсалициловой кислоты. Средняя масса таблетки 530 мг.

### **Пример решения**

Выбрать из списка чистых веществ парацетамол, кофеин и ацетилсалициловую кислоту. Ввести значения навесок: парацетамол – 7,2 мг; кофеин – 1,1 мг; ацетилсалициловая кислота – 9,2 мг, соответствующие навеске порошка таблеток 20 мг. Выбрать растворитель – воду. Выбрать мерную колбу вместимостью 50 мл и "растворить" вещества. Выбрать фильтр – Digaroge Membrane Filter - PVDF, "профильтровать" раствор и "перенести" 50 мкл раствора образца в пробирку № 2 автодозатора хроматографа. Записать полученный образец в коллекцию образцов. Перейти к выбору условий разделения. Открыть метод "БД-2003" и получить хроматограмму. На рис 1 показано сравнение полученной с помощью тренажёра и экспериментальной хроматограмм лекарственного средства "Цитрамон-П" для выбранных условий разделения.

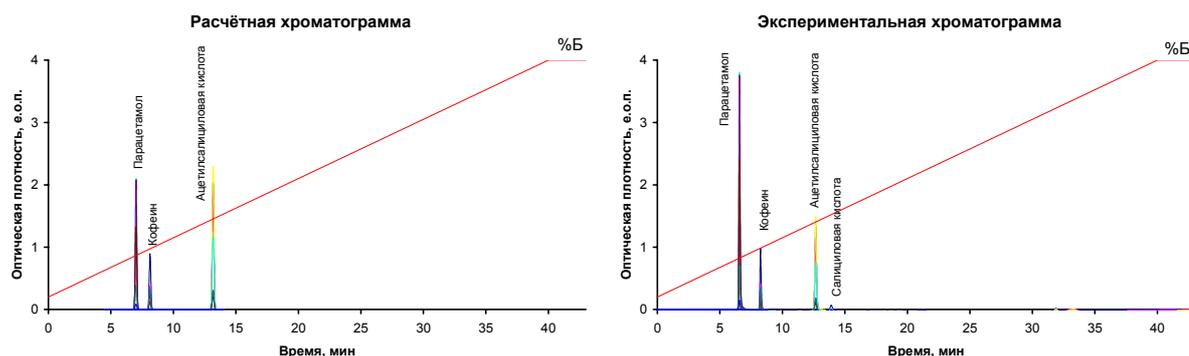


Рис. 1. Сравнение расчётной и экспериментальной хроматограмм лекарственного средства "Цитрамон-П" в условиях линейного градиента концентрации ацетонитрила.

Полученную хроматограмму экспортировать в обрабатывающую программу "Мультихром-СПЕКТР". Сформировать "Спектральный отчёт"; в полученном отчёте содержатся данные о содержании каждого из компонентов в анализируемом образце. Рассчитать содержание анализируемых веществ в таблетке и сравнить с номинальным содержанием.

Вопрос для учащегося: интерпретировать дополнительный пик на экспериментальной хроматограмме и объяснить его присутствие.

Перед тем как ответить необходимо: в обрабатывающей программе открыть "Мастер распознавания" и с его помощью идентифицировать дополнительный пик по спектральным отношениям.

Правильный ответ: Дополнительный пик – это пик салициловой кислоты. Причина появления этого пика – гидролиз ацетилсалициловой кислоты в водном растворе.

### Задача 1б

Разделить компоненты лекарственного средства "Цитрамон-П" за время не более 5 мин с коэффициентом разрешения  $R_s \geq 2$ .

### Пример решения

На основании результатов разделения лекарственного средства "Цитрамон-П", полученных при решении задачи 1а, оптимизировать условия разделения. В окне выбора условий анализа выбрать следующие условия:

температура колонки:	40°C;
объём вводимой пробы:	4 мкл;
постоянная времени детектора:	0,34 с;
длины волн детектирования:	210 нм;
состав подвижной фазы:	градиент: 5 – 30% Б за 700 мкл; 30 – 35% Б за 800 мкл, 35% Б за 300 мкл.
скорость потока:	300 мкл/мин.

Сформировать метод анализа и получить хроматограмму (для отбора пробы выбрать пробирку автодозатора № 2 – в ней находится образец лекарственного средства "Цитрамон-П", оставшийся после решения задачи 1а).

Сравнить расчётную хроматограмму с экспериментальной, полученной в тех же условиях на реальном хроматографе.

На рис. 2 представлено сравнение полученной с помощью тренажёра и экспериментальной хроматограмм лекарственного средства "Цитрамон-П" для выбранных условий разделения. Разделение в выбранных условиях занимает около 4 минут;  $R_s$  не менее 2,37.

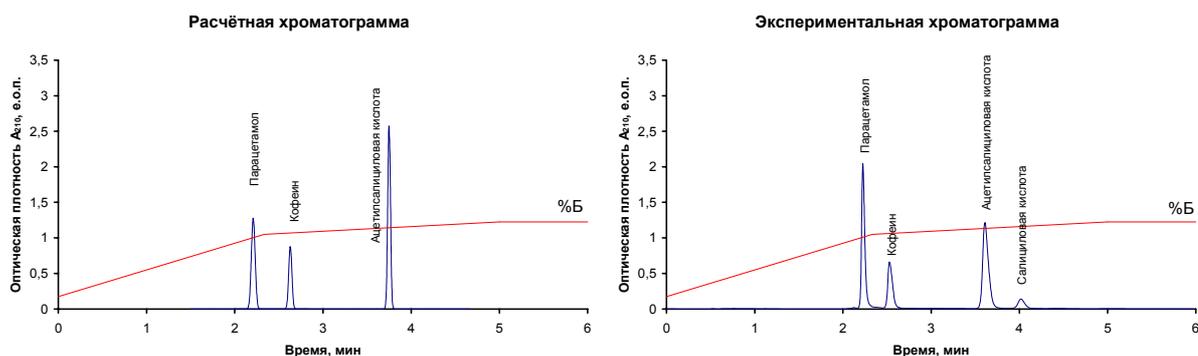


Рис. 2. Сравнение расчётной и экспериментальной хроматограмм лекарственного средства "Цитрамон-П" в условиях кусочно-линейного градиента концентрации ацетонитрила.

## Задача 2

Определить массовую долю кофеина в пакетированном зелёном чае с применением базы данных "ВЭЖХ-УФ" [34].

### Пример решения

В окне "Выбор готового образца сложного состава" выбрать образец "Зелёный чай", "поместить" 50 мкл образца в пробирку, "установить" пробирку в гнездо № 3 автодозатора. Перейти к выбору условий анализа. Загрузить метод "БД-2003" и начать анализ. Полученную хроматограмму экспортировать в обрабатывающую программу "Мультихром-СПЕКТР". Скорректировать разметку хроматограммы таким образом, чтобы пики были максимально гомогенными. Сформировать "Спектральный отчёт"; найти в отчёте данные о содержании кофеина в образце.

На рис. 3 изображена хроматограмма зелёного чая, полученная с помощью тренажёра. Концентрация кофеина в образце составила  $0,30 \pm 0,03$  мг/мл.

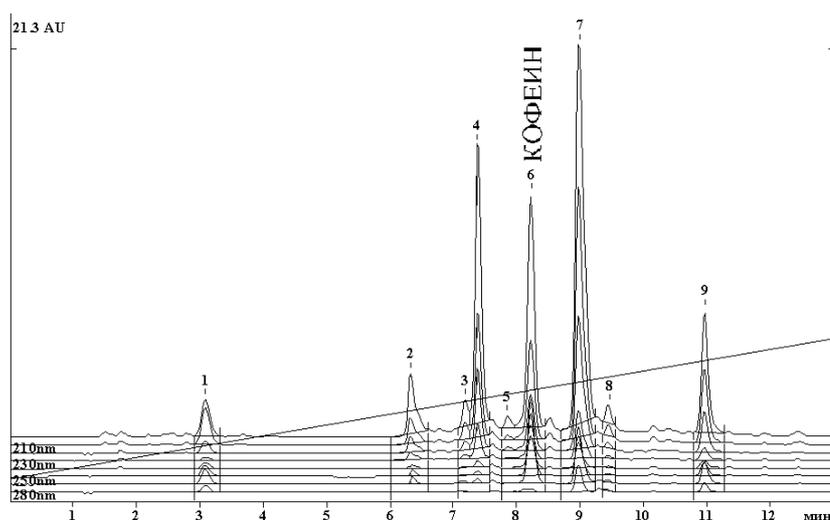


Рис 3. Хроматограмма зелёного чая полученная с помощью тренажёра в условиях методики [34] и обработанная в программе "Мультихром-СПЕКТР"

В окне подготовки образца открыть "Информационный лист" к образцу зелёного чая. Согласно листу, образец готовили, экстрагируя пакет чая массой 2 г водой (250 мл) при  $90^{\circ}\text{C}$ . Из этих данных рассчитать массовую долю кофеина в сухом чае:

$$\omega_{\text{коф}} = \frac{c_{\text{коф}} \cdot V_{\text{экстракта}}}{m_{\text{сухого чая}}} \cdot 100\% = \frac{(0,30 \pm 0,03) \text{ мг / мл} \cdot 250 \text{ мл}}{2000 \text{ мг}} \cdot 100\% = 3,8 \pm 0,4\% .$$

### Задача 3

Разделить смесь двух пептидов, содержащую 0,5 мг/мл пептида структуры *LNPE<sub>2</sub>SLV* и 0,1 мг/мл пептида структуры *LNPE<sub>2</sub>SWV*. Установить соответствие хроматографических пиков компонентам смеси.

### Пример решения

В окне подготовки образца перейти к подготовке смеси пептидов известного состава. Ввести структуры пептидов и значения навесок: *LNPE<sub>2</sub>SLV* – 50,0 мг; *LNPE<sub>2</sub>SWV* – 10,0 мг. Выбрать растворитель – 0,01 М водный раствор HCl. Выбрать мерную колбу вместимостью 100 мл и "растворить" вещества. Выбрать фильтр – Durapore Membrane Filter – PVDF для водных растворов, "профильтровать" раствор и "перенести" 50 мкл раствора образца в пробирку № 4 автодозатора хроматографа. Перейти к выбору условий разделения. Открыть метод "Пептиды" и запустить анализ. К полученной хроматограмме сформировать отчёт с таблицей спектральных отношений, как показано на рис. 4.

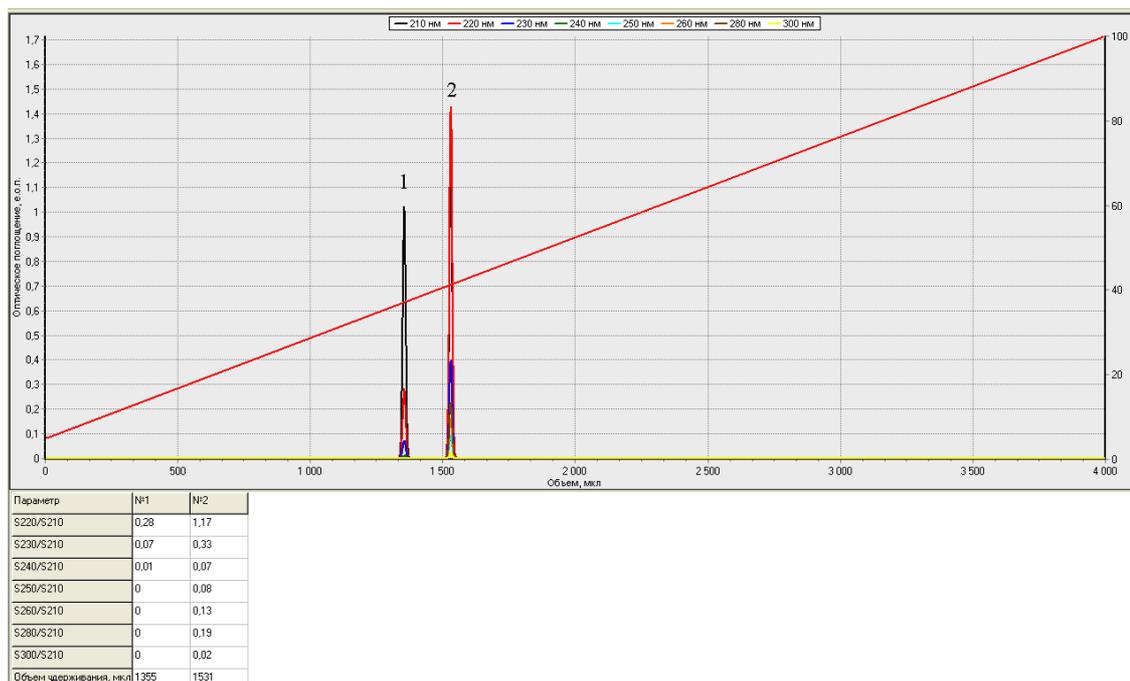


Рис. 4. Расчётная хроматограмма смеси пептидов, полученная с помощью тренажёра.

Из всех аминокислот, входящих в состав анализируемых пептидов, в диапазоне длин волн от 250 до 300 нм поглощает только триптофан (*W*), присутствующий в пептиде *LNPE<sub>2</sub>SWV*, поэтому из отчёта, показанного на рис. 4, можно сделать вывод:

Пик № 1 – пептид состава *LNPE<sub>2</sub>SLV*;

пик № 2 – пептид состава *LNPE<sub>2</sub>SWV*.