



Современные аспекты хроматографии

Лекция на тему: **Выбор и оптимизация хроматографического анализа**

**Минажева Гүлшарат Салауатовна –
доктор педагогических наук, кандидат
химических наук, профессор кафедры
АКХиТРЭ**

Основные этапы оптимизации методики анализа

Оптимизация методики анализа – нам нужно для достижения лучшей чувствительности, точности, воспроизводимости и эффективности.

ОМА включает в себя изменение условий анализа, таких как тип используемого оборудования, реагенты, параметры измерения и другие факторы, чтобы достичь наилучших результатов анализа.

- Выбор целевых спецификаций
- Выбор оптимизируемых параметров
- Разработка процедуры оптимизации
- Эксперименты и их моделирование
- Валидация методики при оптимизированных параметрах

1. Выбор целевых спецификаций - определение критериев, которым должен соответствовать метод анализа, чтобы удовлетворить требования анализируемого образца и целей исследования.

ВЦС включает определение предельных значений параметров анализа, таких как чувствительность, предел обнаружения, предел количественного определения и др., в соответствии с требованиями и целями исследования.

2. Выбор оптимизируемых параметров - идентификация переменных, которые можно изменить или настроить для улучшения метода анализа.

ВОП включает выбор параметров, таких как тип образца, химические реагенты, условия анализа (температура, давление, время и т. д.), которые могут быть настроены для достижения лучших результатов.

3. Разработка процедуры оптимизации - создание плана действий для изменения и настройки оптимизируемых параметров с целью улучшения методики анализа.

РПО включает разработку последовательности шагов, которые будут предприняты для изменения параметров анализа, проведения экспериментов и оценки полученных результатов.

4. Эксперименты и их моделирование - проведение практических исследований и/или использование математических моделей для оценки влияния изменений параметров анализа на результаты исследования.

ЭиМ включает проведение лабораторных экспериментов, а также применение математических и статистических методов для анализа полученных данных и прогнозирования оптимальных значений параметров.

5. Валидация методики при оптимизированных параметрах - подтверждение соответствия оптимизированной методики анализа требованиям качества и целям исследования.

ВМпОП включает оценку точности, чувствительности, воспроизводимости и других характеристик метода анализа после его оптимизации для подтверждения его пригодности для использования в конкретных целях исследования.

Важные спецификации

- Точность и прецизионность

Точность – это мера того, насколько близки результаты измерения к истинному значению измеряемой величины. Точные измерения характеризуются низким уровнем случайных ошибок и высокой степенью соответствия между измеренными значениями и реальными значениями. Например, если результаты измерений очень близки к целевому значению, мы говорим о высокой точности.

Прецизионность - это мера того, насколько однородны или согласованы результаты между собой при повторных измерениях. Прецизионные измерения характеризуются низким уровнем систематических ошибок и малыми разбросами в значениях при повторных измерениях. Т.е., прецизионные измерения дают одинаковые результаты при повторном измерении одного и того же объекта в одинаковых условиях.

Таким образом, точность оценивает близость измеренных значений к истинным значениям, а прецизионность - степень согласованности и однородности результатов измерений между собой.

- Стоимость и длительность анализа 1 пробы
- Пределы обнаружения аналитов
- Надежность

Точность и прецизионность:

Точность описывает степень близости измеренного значения к истинному или известному значению, в то время как прецизионность характеризует степень повторяемости измерений при повторных испытаниях.

Точный метод анализа обеспечивает результаты, близкие к истинным значениям концентрации аналита, в то время как прецизионный метод обеспечивает малую изменчивость результатов при многократном повторении анализа.

Стоимость и длительность анализа 1 пробы:

Стоимость определяет затраты на проведение анализа одной пробы, включая расходы на оборудование, реактивы, время аналитика и другие ресурсы. Длительность анализа одной пробы указывает на время, необходимое для выполнения полного процесса анализа от подготовки образца до получения результатов.

Выбор методики анализа зависит от баланса между стоимостью и длительностью анализа: более быстрые и доступные по стоимости методы могут быть предпочтительными в некоторых случаях, хотя они могут иметь ограничения в точности и чувствительности.

Пределы обнаружения аналитов:

Предел обнаружения определяет минимальное количество аналита, которое можно обнаружить методом анализа при заданных условиях. Он обычно определяется как величина, при которой сигнал от аналита превышает уровень фона во столько-то раз.

Более низкий предел обнаружения означает, что метод способен обнаруживать более низкие концентрации аналита, что особенно важно при анализе следовых уровней веществ в образцах.

Надежность:

Надежность методики анализа характеризует ее способность давать воспроизводимые результаты при различных условиях анализа и при повторных измерениях.

Надежный метод анализа должен обеспечивать стабильные результаты независимо от изменений условий, таких как тип оборудования, квалификация оператора и другие факторы, а также должен быть способен воспроизводить результаты при многократном проведении анализа одного и того же образца.

Это ключевой аспект в АХ, который обеспечивает точность, повторяемость и воспроизводимость результатов анализа.

Основные параметры ГХ анализа

- Объем пробы и деление потока
- Температура устройства для ввода проб
- Температура термостата колонки
- Колонка, ее размеры и скорость газа-носителя
- Параметры детектирования

Основные параметры ЖХ анализа

- Колонка
- рН подвижной фазы
- Соотношение воды и органического модификатора
- Скорость потока и температура колонки
- Параметры детектирования
- Объем пробы

Протокол (план) эксперимента

- Цель и гипотеза
- Независимая (оптимизируемая) переменная
- Зависимые переменные + их измерение
- Контролируемые переменные + способ контроля
- Детальное описание материалов, оборудования и процедур

Протокол (план) эксперимента - представляет собой документ, в котором подробно описываются цель эксперимента, предполагаемые гипотезы, используемые методы и процедуры, а также параметры и условия, необходимые для его проведения.

ПЭ служит руководством для проведения исследования, обеспечивая структурированный подход к экспериментальной работе и обеспечивая возможность повторяемости и воспроизводимости результатов.

Цель и гипотеза - определяет основную цель эксперимента, то есть то, что исследователь намеревается достичь или выяснить.

Гипотеза – это предположение, высказываемое на основе определенных данных или предыдущих наблюдений, о том, что произойдет в результате эксперимента. Гипотеза может быть подтверждена, опровергнута или требует дальнейших исследований.

Независимая (оптимизируемая) переменная - это переменная, которую экспериментатор систематически меняет или манипулирует в процессе эксперимента.

Независимая переменная представляет условия, которые изменяются для проверки их влияния на зависимые переменные. Она обычно меняется для того, чтобы определить, какие эффекты она может иметь на исследуемые явления.

Зависимые переменные + их измерение - это переменные, значения которых зависят от изменений независимых переменных.

Зависимые переменные измеряются для определения, как изменения независимых переменных влияют на результаты эксперимента. Их изменения являются результатом действия независимой переменной.

Контролируемые переменные + способ контроля - это условия или факторы, которые остаются постоянными во время эксперимента.

Они контролируются для того, чтобы исключить или минимизировать влияние других факторов на результаты эксперимента. Способ контроля заключается в том, чтобы обеспечить одинаковые условия для всех испытательных условий, за исключением тех, которые систематически меняются.

Детальное описание материалов, оборудования и процедур - это часть протокола эксперимента, включающая информацию о всех материалах, оборудовании и методах, используемых в эксперименте.

Детальное описание необходимо для того, чтобы обеспечить полную прозрачность и воспроизводимость эксперимента другими исследователями. Включение таких сведений позволяет другим повторить эксперимент и проверить его результаты.

Независимые переменные:

-Время (обычно в минутах) - это переменная, которая управляется параметрами работы хроматографической системы, такими как скорость потока носителя, температура, состав фазы.

-Длина колонки - длина хроматографической колонки, которая влияет на разделение аналитов.

Зависимые переменные:

-Retention Time (время удержания) - это время, которое требуется аналиту для прохождения через колонку. Оно зависит от физико-химических свойств аналита и условий работы хроматографии.

-Площадь пика - это площадь под кривой пика аналита на хроматограмме, которая является мерой количества аналита, разделенного в определенный момент времени.

-Ширина пика - это ширина пика аналита на хроматограмме, которая отражает степень разделения аналита от других компонентов и может быть связана с различными параметрами хроматографической системы.

Эти переменные используются для оценки эффективности разделения аналитов в хроматографии и для оптимизации условий анализа.

Пример эксперимента по оптимизации одного параметра

- Цель: оптимизировать время твердофазной микроэкстракции фенола из воды
- Гипотеза: время экстракции 10 мин обеспечивает наибольший отклик аналита (по теории)
- Независимая переменная: Время экстракции
- Зависимая переменная: Площадь пика фенола (ГХ-МС)

Контролируемые переменные

- Покрытие: Car/PDMS
- Температура экстракции: 40°C
- Объем образца: 5,00 мл
- Концентрация фенола: 1,00 мг/л

Выбраны по теории и результатам предыдущих экспериментов

Независимая переменная

- Значения: 1, 2, 5, 10, 20, 30 и 60 мин
- Изучаемый диапазон зависит от теории
- Точность замера будет обеспечена автосамплером
- Для каждого времени экстракции будут приготовлены три отдельных экспериментальных образца ($7 \times 3 = 21$ образец)

Зависимая переменная

- Площадь пика фенола (ГХ-МС)
- Будет определена для каждого образца
- По результатам трех параллельных измерений будет определено среднее значение
- Премахи будут исключены

Краткая процедура

- Приготовить 250 мл раствора фенола в воде (1 мг/л)
- Ввести по 5,00 мл раствора в каждую виалу (21 шт.)
- Приготовить прибор, установить волокно Car/PDMS
- Поместить все виалы (21 шт.) в автосамплер
- Приготовить 7 методов в ПО для каждого времени экстракции. Подготовить и запустить последовательность

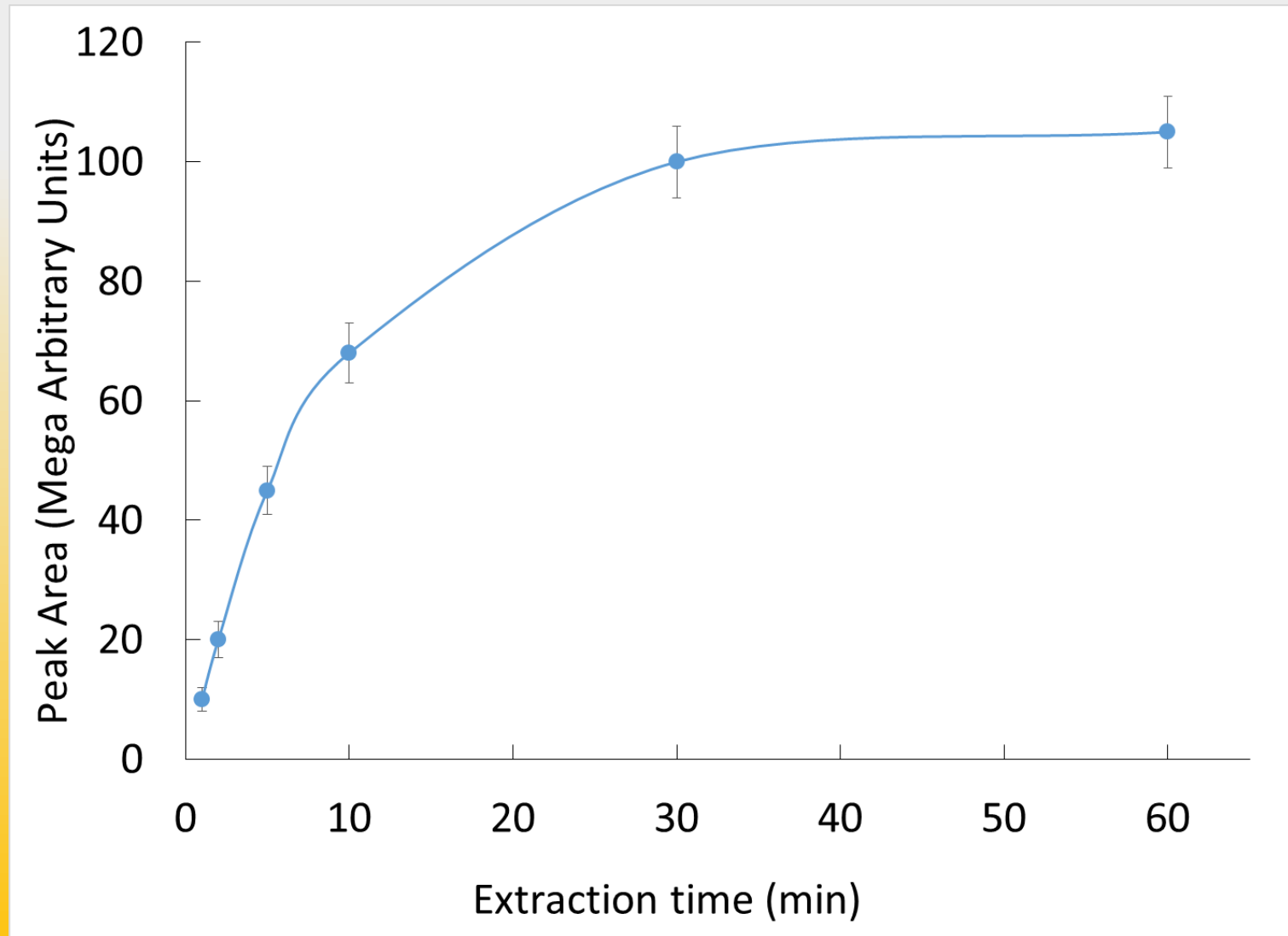
Краткая процедура (продолжение)

- Подождать до конца анализа
- Определить площадь пика фенола на каждой хроматограмме
- Ввести полученные данные в файл Excel
- Построить зависимость “ $S = f$ (время экстракции)”

Таблица с данными

Время экстракции (мин)	Площадь пика фенола (y.e.)				SD (y.e.)
	Пар. 1	Пар. 2	Пар. 3	Среднее	
1					
2					
5					
10					
20					
30					
60					

Ожидаемый график



Примерные выводы

- Гипотеза не была подтверждена
- Наибольший отклик обеспечивает время > 30 мин
- Методология была не совсем идеальной – прецизионность была хуже, чем ожидалось. Это может быть вызвано неподходящей прокладкой
- В рамках следующего эксперимента будет оптимизирована добавка соли

Задача

Разработайте план эксперимента по оптимизации:

- концентрации п-нитробензальдегида для полной дериватизации 1,1-диметилгидразина
- температуры термостата колонок для максимально эффективного и быстрого разделения компонентов автомобильного бензина методом газовой хроматографии на колонке DB-Petro 100 м x 0,25 мм, толщина пленки 0,50 мкм

Рекомендации

- Больше времени на планирование
- Всегда делайте в нескольких параллелях
- Записывайте всю информацию
- Не начинайте следующий эксперимент, пока детально не опишете предыдущий

Оптимизация нескольких параметров

- Все комбинации
- Последовательная оптимизация (по очереди)
- Используя статистические методы

Все комбинации

#	Parameter 1	Parameter 2	Parameter 3
1	1	1	1
2	1	1	2
3	1	1	3
4	1	2	1
5	1	2	2
6	1	2	3
7	1	3	1
8	1	3	2
9	1	3	3
10	2	1	1
11	2	1	2
12	2	1	3
13	2	2	1
14	2	2	2
15	2	2	3
16	2	3	1
17	2	3	2
18	2	3	3
19	3	1	1
20	3	1	2
21	3	1	3
22	3	2	1
23	3	2	2
24	3	2	3
25	3	3	1
26	3	3	2
27	3	3	3

Последовательная оптимизация

- Оптимизация параметра 1 (экстр. покрытие)
- Оптимизация параметра 2 (Т экстракции)
- Оптимизация параметра 3 (время экстракции)
- Оптимизация параметра 4 (добавка соли)
- Оптимизация параметра 5 (объем пробы)

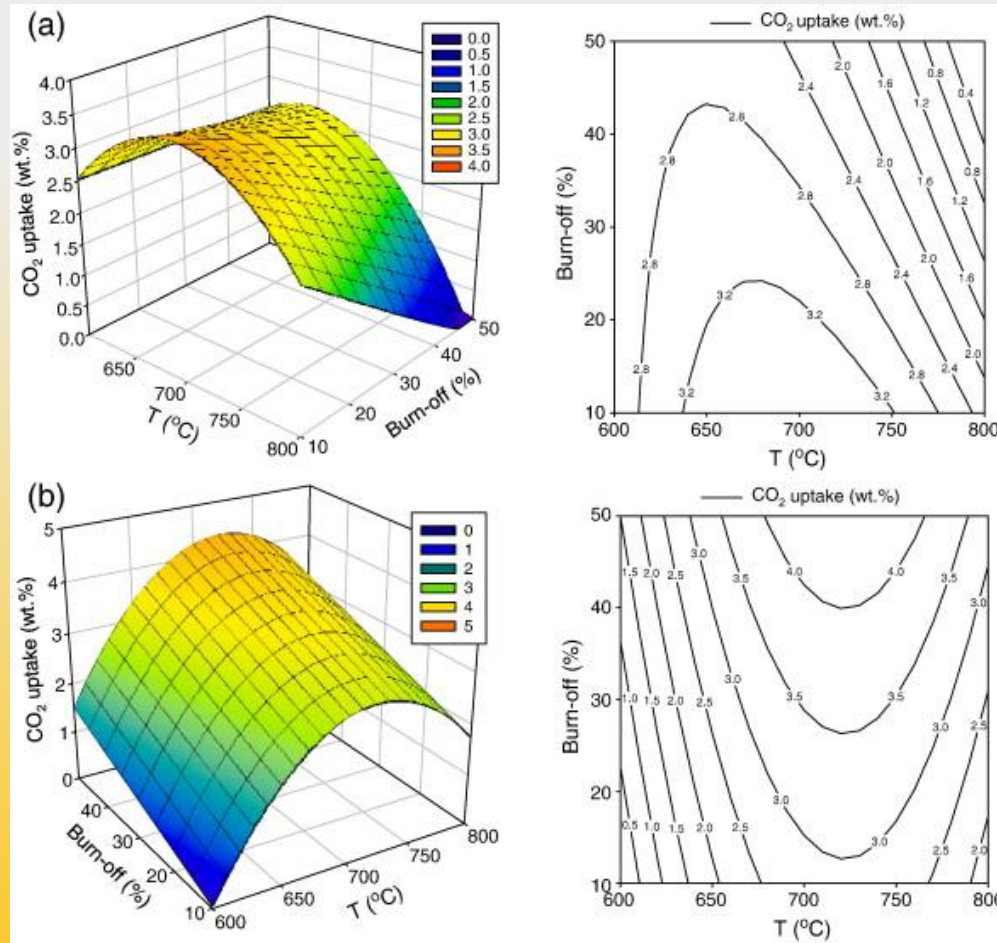
Сравнение: все комбинации vs последовательная

#	Parameter 1	Parameter 2	Parameter 3
1	1	1	1
2	1	1	2
3	1	1	3
4	1	2	1
5	1	2	2
6	1	2	3
7	1	3	1
8	1	3	2
9	1	3	3
10	2	1	1
11	2	1	2
12	2	1	3
13	2	2	1
14	2	2	2
15	2	2	3
16	2	3	1
17	2	3	2
18	2	3	3
19	3	1	1
20	3	1	2
21	3	1	3
22	3	2	1
23	3	2	2
24	3	2	3
25	3	3	1
26	3	3	2
27	3	3	3

#	Parameter 1	Parameter 2	Parameter 3
1	1	1	1
2	1	1	2
3	1	1	3
4	1	1	2
5	1	2	2
6	1	3	2
7	1	3	2
8	2	3	2
9	3	3	2

**Оптимальные параметры
отмечены жирным шрифтом**

Response Surface Optimization Оптимизация поверхности отклика



Response Surface Optimization (RSO) - это метод оптимизации, используемый в экспериментальном дизайне для поиска оптимальных условий при многомерных процессах или системах. Он основан на моделировании поверхности отклика, которая описывает зависимость выходного параметра (отклика) от различных входных факторов.

Во многих экспериментальных исследованиях существует необходимость оптимизировать процессы или системы, чтобы достичь желаемых результатов. Однако при наличии нескольких входных факторов это может быть сложно сделать путем простого изменения одного параметра за раз.

Вместо этого **Response Surface Optimization** использует статистические методы и математическое моделирование для анализа влияния нескольких факторов одновременно и определения наилучших комбинаций этих факторов для достижения целевого отклика.

Важной частью этого процесса является построение модели поверхности отклика, которая описывает форму зависимости отклика от входных факторов. Эта модель может быть линейной или нелинейной, может включать в себя квадратичные и взаимодействующие члены для учета сложных отношений между переменными.

После построения модели происходит оптимизация, которая включает в себя поиск комбинации входных параметров, при которой достигается максимальный или минимальный отклик в соответствии с заданными критериями оптимизации.

Оптимизация поверхности отклика широко применяется в различных областях, таких как инженерия, химия, биология, экономика и другие, где необходимо оптимизировать сложные процессы или системы для достижения желаемых результатов.

Повышение эффективности процесса оптимизации

- Использование известных знаний (лит. обзор)
- Использование теоретических предсказаний
- Использование математического моделирования
- Логическое ранжирование параметров

Выберите лучший метод для определения
(задания по СРМ):

- Метанола в водке
- Этанолола в крови
- Сорбиновой кислоты в соках
- Нафталина в воздухе
- Гексахлорбензола в винограде

Выберите лучший метод для определения
(задания по СРМ):

- Полифенолов в пыли
- Альдегидов в воздухе
- Неорганических катионов в воде
- Пестицидов в продуктах питания
- Ароматических углеводородов в бензине



ВОПРОСЫ ???