

# ***МультиХром*** ***для Windows*** ***Версия 1.6х***

Программно-аппаратный комплекс для сбора  
и обработки хроматографических данных

**Руководство по работе с модулем  
для гель-проникающей хроматографии**



**АМПЕРСЕНД**  
**2008**

## ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ И ТОРГОВЫЕ МАРКИ АВТОРСКИЕ ПРАВА

E-mail: support@ampersand.ru ("горячая линия")

Телефон/факс: (499) 196-52-90; (499) 196-18-57

Почтовый адрес: 123060 Москва, а/я 80, ЗАО "АМПЕРСЕНД"

### ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ И ТОРГОВЫЕ МАРКИ АВТОРСКИЕ ПРАВА

МультиХром, АМПЕРСЕНД, AMPERSAND - ЗАО "АМПЕРСЕНД"

IBM, IBM PC - International Business Machines, Corp.

MS-DOS, MS WINDOWS - Microsoft, Corp.

© ЗАО "АМПЕРСЕНД"

---

Исключительное право тиражирования программы *МультиХром* и ее документации принадлежит ЗАО "АМПЕРСЕНД" и охраняется законодательством Российской Федерации, Всемирной Конвенцией по авторским правам, а также прямыми обязательствами официальных пользователей, оговоренными в лицензионном соглашении.

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b>	<b>3</b>
<b>Введение</b>	<b>5</b>
Общее описание процедуры определения ММР	5
Методы градуировки	5
Выполнение расчетов	6
Замечания об особенностях модуля ГПХ для пользователей, имеющих опыт работы с системой “МультиХром”	6
<b>Создание методов ГПХ</b>	<b>7</b>
Разметка хроматограммы ГПХ	7
Построение базовой линии	7
Задание параметров разметки	8
Первая градуировка	9
Создание таблицы компонентов	9
Получение градуировочной зависимости	10
Метод Монодисперсный	11
Метод Полидисперсный	12
Метод Универсальный	13
Завершение градуировки и запись метода	13
Печать результатов градуировки	13
<b>Получение хроматограмм с использованием методов ГПХ</b>	<b>14</b>
Определение ММР	14
Добавление и удаление градуировочных хроматограмм	14
Добавление данных для образца с исходным набором монодисперсных фракций	14
Добавление данных для образца с измененным набором монодисперсных фракций	15
Объединение нескольких независимо полученных хроматограмм	15
Удаление градуировочной хроматограммы	16
<b>Особенности отчетов для ГПХ</b>	<b>17</b>
Настройки опций отчета	17
Вид отчета	18
Предметный указатель	20



---

## Введение

---

В состав программного обеспечения программно-аппаратного комплекса “МультиХром”, версия 1.6x в дополнение к ПО версии 1.5x включен специализированный модуль для расчета молекулярно-массового распределения полимеров (ММР) по хроматограммам, полученным методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ), в дальнейшем именуемый *модуль ГПХ*.

Настоящее **Руководство по работе с модулем для гель-проникающей хроматографии** (далее - **Руководство**) содержит дополнительные сведения, необходимые для работы с модулем ГПХ, которые могут потребоваться пользователю, имеющему опыт работы с системой “МультиХром”. Пользователям, впервые осваивающим систему “МультиХром”, рекомендуется следующее:

- Если “МультиХром” предполагается использовать как для проведения количественного и качественного анализа смесей, так и для определения ММР, следует вначале изучить методы работы с системой, описанные в **Руководстве пользователя** для работы с версией 1.5x (далее - **РП**), а затем ознакомиться с особенностями работы модуля ГПХ по настоящему **Руководству**.
- Если “МультиХром” предполагается использовать *только* для определения ММР, следует сначала установить систему, ознакомившись с разделами **РП: Введение** и **Установка и настройка**, а затем перейти к настоящему **Руководству**, обращаясь к разделам основного **РП** в соответствии с указаниями в тексте.

### **Общее описание процедуры определения ММР**

Определение ММР с помощью ГПХ основано на зависимости времени выхода фракции высокомолекулярного вещества от молекулярной массы составляющих ее молекул.

Процедура определения ММР состоит из двух этапов. Первый – получение хроматограмм (одной или нескольких) для образца с известным ММР и определение по ней градуировочной зависимости, второй – получение хроматограммы исследуемого образца и расчет для него с помощью ранее полученной градуировочной зависимости параметров ММР.

### **Методы градуировки**

В программе предусмотрены три метода градуировки с использованием образцов двух типов.

Первый метод предназначается для градуировки по полидисперсным образцам с широким ММР, которые характеризуются двумя параметрами – средней молекулярной массой **M<sub>n</sub>** и средневзвешенной молекулярной массой **M<sub>w</sub>**. При этом предполагается линейная связь между логарифмом молекулярной массы **Ig(M)** и временем выхода **T**:

$$\lg(M) = k_0 - k_1 \cdot T$$

Коэффициенты **k<sub>0</sub>** и **k<sub>1</sub>**, рассчитанные при градуировке, далее используются для определения параметров ММР исследуемого образца.

Для второго, наиболее распространенного метода требуются градуировочные образцы, содержащие несколько монодисперсных фракций, характеризующиеся величинами молекулярной массы для каждой фракции. При этом для аппроксимации градуировочной зависимости можно использовать не только линейную, но также квадратичную или кубическую функцию:

$$\lg(M) = k_0 - k_1 \cdot T + k_2 \cdot T^2$$

$$\lg(M) = k_0 - k_1 \cdot T + k_2 \cdot T^2 + k_3 \cdot T^3$$

При использовании градуировочной зависимости вида **Ig(M) = F(T)** предполагается, что и градуировка, и последующие измерения выполняются не только в одинаковых условиях, но и с использованием образцов *одного и того же* высокомолекулярного соединения.

Третий метод предназначен для определения ММР в случае, когда градуировка выполнена для образца *другого* соединения, с использованием *универсальной* зависимости **Ig([v]•M) = F(T)**, где **[v] = K•M<sup>α</sup>** – характеристическая вязкость. Для использования этого метода необходимо знать

параметры  $K$  и  $\alpha^1$  как для градуировочного, так и для исследуемого образца. Градуировка производится аналогично второму методу (используются образцы, содержащие набор монодисперсных фракций; функция  $F(T)$  может быть аппроксимирована полиномом 1-3 степени).

### Выполнение расчетов

При выполнении расчетов вся хроматограмма разбивается на малые *интервалы (кванты времени)*. Для каждого  $i$ -ого интервала значение молекулярной массы  $M_i$  считается постоянным, а количество вещества – пропорциональным площади  $A_i$ , заключенной в пределах этого интервала между хроматографической кривой и базовой линией. Величина интервала задается пользователем, при этом точность расчета ММР возрастает с уменьшением интервала, но одновременно возрастает время расчета.

При проведении градуировки по полидисперсному образцу программа сначала рассчитывает методом последовательных приближений величину  $k_1$  из соотношения

$$M_w/M_n = (\sum(A_i \cdot 10^{-k_1 \cdot T_i}) / \sum A_i) / (\sum A_i / \sum(A_i / 10^{-k_1 \cdot T_i}))$$

а затем величину  $k_0$  из соотношения

$$M_w = k_0 \cdot \sum(A_i \cdot 10^{-k_1 \cdot T_i}) / \sum A_i$$

Для исследуемого образца программа рассчитывает следующие параметры ММР:

$$M_n = \sum A_i / \sum(A_i / M_i)$$

$$M_w = \sum(A_i \cdot M_i) / \sum A_i$$

$$M_z = \sum(A_i \cdot M_i^2) / \sum(A_i \cdot M_i)$$

$$M_{z+1} = \sum(A_i \cdot M_i^3) / \sum(A_i \cdot M_i^2)$$

где  $M_i$  - значение молекулярной массы, рассчитанное по градуировочной зависимости для значения времени удерживания  $T_i$ , а суммирование производится по всем интервалам в пределах *области анализа* (см. раздел *Разметка хроматограммы ГПХ*).

### Замечания об особенностях модуля ГПХ для пользователей, имеющих опыт работы с системой "МультиХром"

Если в состав системы "МультиХром" включен модуль ГПХ, лист *Общие* имеет дополнительный флажок **Гель-проникающая хроматография (ГПХ)**. Переход к модулю ГПХ осуществляется путем установки этого флажка, а также при запуске метода или открытии хроматограммы, у которых этот флажок был установлен.

Первое значительное отличие модуля ГПХ относится к способу разметки: на хроматограмме выделяется *область анализа*, для которой строится общая базовая линия. Необходимые для этого дополнительные параметры вводятся на листе *Параметры ГПХ* окна **Параметры разметки**.

Второе, наиболее важное отличие касается процедуры *градуировки*: при проведении количественного и качественного анализа целью градуировки является определение зависимости *отклик – концентрация*, а при расчете ММР – зависимости *удерживание – молекулярная масса*. Следствием этого отличия являются следующие особенности градуировки:

- Не создается *Таблица концентраций*.
- В результате градуировки получается единственная градуировочная зависимость, а не набор зависимостей для всех компонентов. При этом вместо набора окон **Компонент** параметры градуировки задаются через единственное окно **Градуировка ГПХ**.
- Каждая точка градуировочной зависимости соответствует одному *компоненту из Таблицы компонентов*, а не градуировочной *хроматограмме*.
- Для построения *всей* градуировочной зависимости может быть достаточно *одной* градуировочной хроматограммы при условии, что она содержит все компоненты. Использование нескольких градуировочных хроматограмм, содержащих одни и те же компоненты, позволяет только повысить достоверность получаемых данных.

Третьей существенной особенностью является представление результата анализа в отчете в виде набора параметров ММР (для этого в окне **Опции отчета** добавлен соответствующий раздел).

<sup>1</sup> Из литературных или экспериментальных данных.

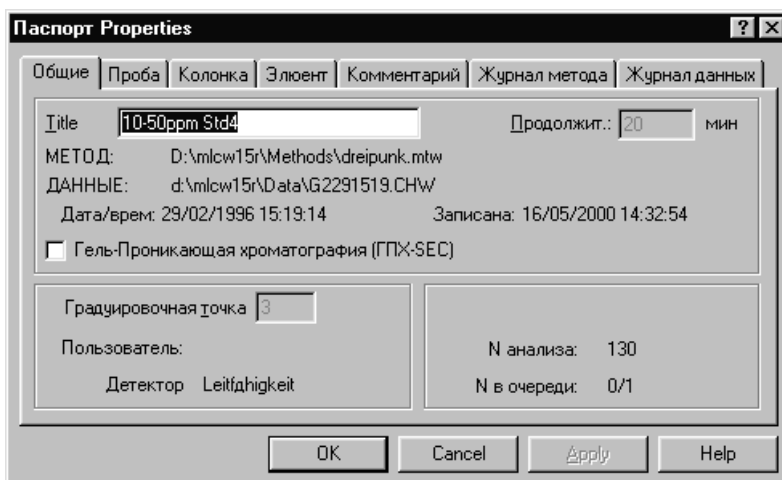
---

## Создание методов ГПХ

---

Метод для работы с модулем ГПХ может быть создан на основе обычного метода. Далее описана процедура создания такого метода в процессе получения первой градуировочной хроматограммы для ГПХ. При выполнении отдельных операций следует руководствоваться разделами **РП: Руководство для начинающих, Этапы 1-4**.

- Запустите программу и откройте какой-либо метод. При этом откроется окно **Запуск анализа**.



- Установите флажок **ГПХ**. При этом появится предупреждение: *Эта операция уничтожит всю градуировку. Продолжить?* Нажмите кнопку **Да**.
- Введите новое имя в поле **Имя**.
- Если требуется, отредактируйте значение в поле **Продолжит.**, а также внесите необходимые изменения на других листах окна.
- Нажмите кнопку **ОК** или клавишу [**Enter**], окно **Запуск анализа** закроется.
- Запустите хроматографический процесс для градуировочного образца, при этом система "МультиХром" начнет сбор данных.

---

## Разметка хроматограммы ГПХ

При создании метода ГПХ на основе обычного метода первая хроматограмма ГПХ по окончании сбора данных не будет размечена, так как для этого необходимы дополнительные параметры: начало и конец *области анализа*, которые задает пользователь, и *значения базы* в начальной и конечной точке области анализа (уровень базовой линии), автоматически рассчитываемые программой. Уровень базовой линии, как правило, определяется по участкам без пиков, специально выделенным пользователем в начале и конце хроматограммы. При этом можно исключить из расчетов участки, непосредственно примыкающие к области анализа, если они содержат случайные пики и провалы (связанные, например, с выходом низкомолекулярных веществ, пузырьков воздуха и пр.) Таким образом, пользователь имеет возможность задать до шести точек, разбивающих хроматограмму на участки: **Начало базовой линии**, **Конец базовой линии**, **Начало пиков**, **Конец пиков**, **Начало области анализа**, **Конец области анализа**.


### Построение базовой линии

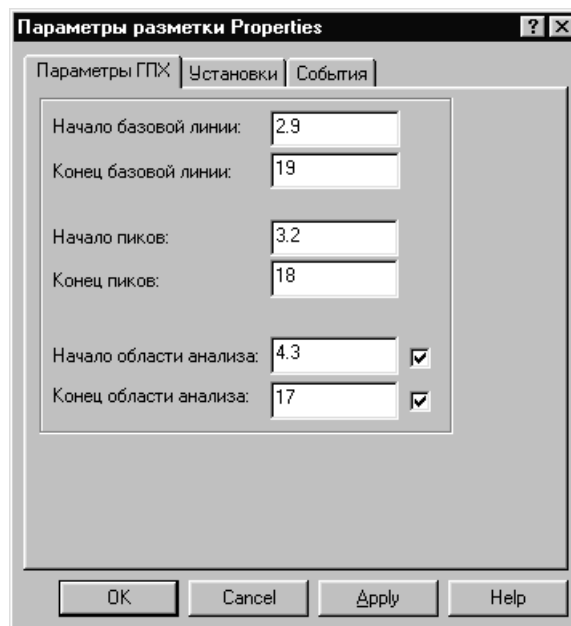
Программа проводит базовую линию для всей области анализа, используя *значения базы* в первой и последней точках этой области. Значения базы рассчитываются способом, который зависит от числа точек на участках, специально выделенных для этой цели в начале и в конце хроматограммы.

- Значение базы в *первой* точке области анализа определяется как:
  - ♦ результат экстраполяции прямой, проведенной по всем точкам начального участка методом наименьших квадратов, если точек больше 5 (рекомендуемый вариант);
  - ♦ среднее значение на начальном участке, если точек не более 5 точек;

- Значение базы в *последней* точке области анализа определяется как:
  - ♦ результат экстраполяции прямой, проведенной по всем точкам конечного участка методом наименьших квадратов, если точек больше 5 (рекомендуемый вариант);
  - ♦ игнорируется, если число точек не более 5.
- Базовая линия проводится следующим образом:
  - ♦ если в первой и последней точках области анализа значения базы определены, базовая линия соединяет эти точки;
  - ♦ если значение базы в последней точке области анализа не определено, базовой линией является экстраполяция базовой линии на начальном участке. В частности, если начальный участок содержит не более 5 точек, базовая линия будет горизонтальной.

### Задание параметров разметки

- Откройте окно **Параметры разметки**, нажав кнопку  или выбрав команду **Метод/Разметка**, при этом на экране будет представлен лист *Параметры ГПХ*.



- Задайте следующие параметры разметки.
  - ♦ **Начало базовой линии** – определяет начало участка для вычисления значения базы в *первой* точке области анализа.
  - ♦ **Начало пиков** – определяет конец участка для вычисления значения базы в *первой* точке области анализа. Значение должно быть *не меньше* величины, заданной в поле **Начало базовой линии**.
  - ♦ **Начало области анализа** – определяет первую точку области анализа. Задается только в том случае, когда *перед* областью анализа требуется выделить участок, который исключается из расчетов. Ввод данных в это поле возможен только при установке расположенного рядом флажка. Если флажок не установлен, первой точкой области анализа является точка **Начало пиков**.
  - ♦ **Конец области анализа** – определяет последнюю точку области анализа. Задается только в том случае, когда *после* области анализа требуется выделить участок, который исключается из расчетов. Ввод данных в это поле возможен только при установке расположенного рядом флажка. Если флажок не установлен, последней точкой области анализа является точка **Конец пиков**.
  - ♦ **Конец пиков** – определяет начало участка для вычисления значения базы в *последней* точке области анализа. Значение должно быть *больше* величины, заданной в поле **Начало пиков**.
  - ♦ **Конец базовой линии** – определяет конец участка для вычисления значения базы в *последней* точке области анализа. Значение должно быть *не меньше* величины, заданной в поле **Конец пиков**.




Процедуру заполнения перечисленных полей рекомендуется выполнять, используя для их обхода клавишу **[TAB]**.

- Перейдите на лист *Установки*, внесите, если требуется, изменения, и нажмите кнопку **OK**. В области анализа будет выполнена разметка на пики: построена общая базовая линия и определены основные пики, промежутки между которыми будут также отмечены как дополнительные пики – таким образом, при интегрировании вся площадь между базовой линией и хроматографической кривой будет отнесена к тому или иному пику, никакая ее часть не останется неучтенной.

Полученную разметку можно откорректировать вручную с помощью *Редактора пиков*, однако следует учитывать, что операции удаления и добавления пиков при работе с модулем ГПХ заблокированы (о разметке см. **РП: Руководство для начинающих, Этапы 5-6; Справочник по основным операциям**, раздел **Интегрирование**).

При использовании ранее созданных методов ГПХ, а также при перезапуске хроматограмм ГПХ разметка будет производиться автоматически в соответствии с установленными на листе *Параметры ГПХ* параметрами.

 Допустимо проведение сбора данных для хроматограмм ГПХ до установки флажка **ГПХ**, но при этом следует уделить особое внимание разметке, так как она будет автоматически выполнена обычным образом. Поэтому после установки флажка **ГПХ** хроматограмму **обязательно** требуется переразметить, задав необходимые параметры на листе *Параметры ГПХ*.

---

## Первая градуировка

Процедура градуировки включает в себя создание *Таблицы компонентов*, выбор метода градуировки и ввод параметров градуировочного образца, а также, при необходимости, корректировку полученной градуировочной зависимости.


В системе предусмотрено проведение градуировки тремя методами (в скобках указаны используемые далее названия методов):

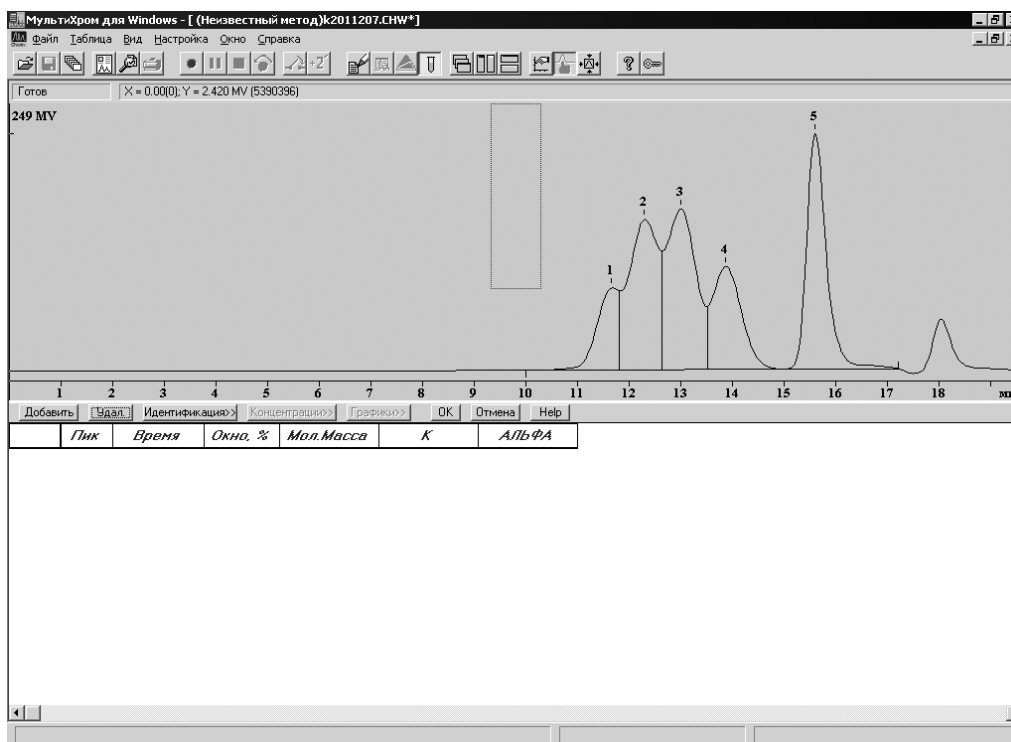
с использованием одного полидисперсного образца, для которого известны параметры ММР (*Полидисперсный*);

с использованием одного или нескольких образцов исследуемого вещества, содержащих ряд монодисперсных компонентов с известными значениями молекулярной массы (*Монодисперсный*);

метод, аналогичный *Монодисперсному*, но позволяющий использовать при градуировке вещества, отличные от исследуемых образцов, если для тех и других известны параметры **K** и **Альфа** (*Универсальный*).

### Создание таблицы компонентов

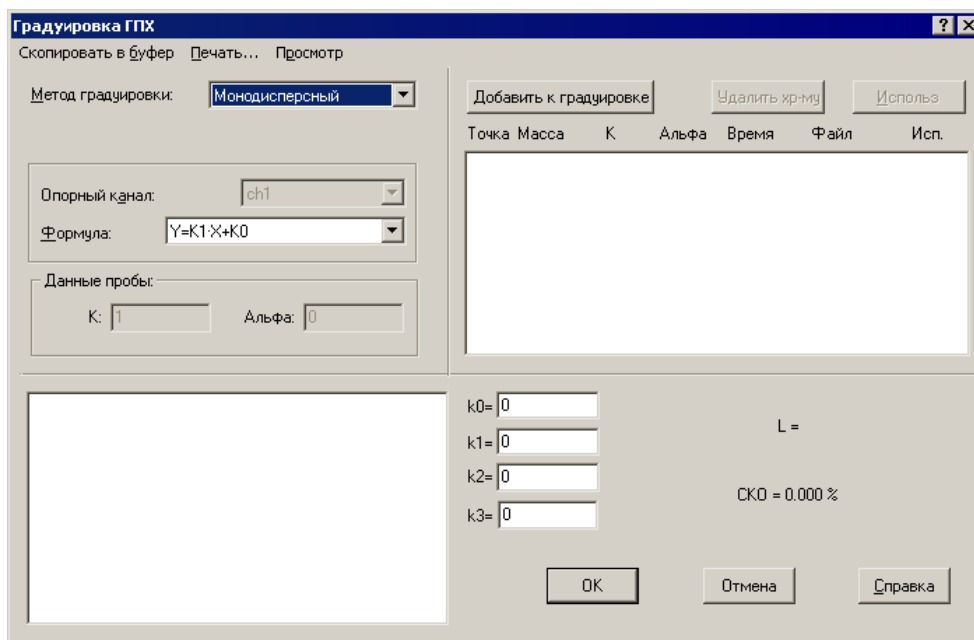
- Откройте *Таблицу компонентов*, нажав кнопку  или выбрав команду **Метод/Градуировка/Компоненты**. *Таблица компонентов* содержит столбцы *Пик*, *Время*, *Окно%*, *Молек.Масса*, *K*, *Альфа* (см. **РП: Количественный и качественный анализ**, раздел **Таблица компонентов**).



- Нажмите кнопку **Добавить**. В *Таблице компонентов* появится первая строка. Если предполагается использовать метод *Полидисперсный*, создание таблицы компонентов на этом завершается.
- Для метода *Монодисперсный* заполните таблицу пиков.
  - ♦ Нажимая кнопку **Добавить**, создайте в таблице столько строк, сколько пиков, соответствующих монодисперсным фракциям, представлено на хроматограмме. При этом в столбце *Пик* автоматически проставляется номер пика на хроматограмме.
  - ♦ Если при градуировке предполагается использовать несколько хроматограмм и первая из них содержит не все фракции, можно добавить строки для отсутствующих фракций, при этом в столбце *Пик* будет указано значение 0. Можно также не создавать такие строки заранее, а добавлять их в *Таблицу компонентов* по мере надобности (см. разделы **Добавление и удаление градуировочных хроматограмм**, **Добавление данных для образца с измененным набором монодисперсных фракций** и **Объединение нескольких независимо полученных хроматограмм**).
  - ♦ В каждой строке ведите в столбец *Молек.Масса* значение молекулярной массы.
  - ♦ Если в таблицу ошибочно введены лишние строки, удалите их, устанавливая на строку курсор и нажимая кнопку **Удалить**.
- Для метода *Универсальный* заполнение *Таблицы компонентов* возможно выполнить двумя способами.
  - ♦ Если для градуировки используется образец, в котором для большинства монодисперсных фракций **K = 1**, **Альфа = 0**, или же все фракции имеют различные значения этих параметров, создайте *Таблицу компонентов* вышеописанным способом, а затем внесите необходимые коррективы в столбцы *K* и *Альфа*.
  - ♦ Если для градуировки используется образец, в котором для большинства монодисперсных фракций **K** и/или **Альфа** имеют одинаковые, но отличные соответственно от 1 и 0 значения, рекомендуется после создания первой строки *Таблицы компонентов* ввести эти значения в окне **Градуировка ГПХ** (см. следующий раздел), а затем завершить формирование таблицы. В этом случае требуемые значения **K** и **Альфа** будут вводиться для всех компонентов по умолчанию.

### **Получение градуировочной зависимости**

- Перейдите в окно **Градуировка ГПХ**, нажав кнопку **График**.



В верхней половине окна расположены поля и кнопки, позволяющие пользователю выбирать метод и задавать параметры градуировки, в нижней – результаты градуировки.

- В списочном поле **Метод** выберите требуемый метод градуировки (по умолчанию установлен *Монодисперсный*).
- Переход от метода *Монодисперсный* или *Универсальный* к методу *Полидисперсный*, а также обратно, сопровождается уничтожением ранее сделанной градуировки, поэтому в этом случае появляется соответствующее сообщение-напоминание. Для подтверждения смены метода нажмите кнопку **Да**.
- Для того чтобы текущая хроматограмма была использована для градуировки, нажмите кнопку **Добавить к градуировке**. Операции, производимые при этом программой, а также дальнейшие процедуры, выполняемые пользователем, зависят от выбранного метода.

### Метод Монодисперсный

При выборе этого метода после нажатия кнопки **Добавить к градуировке** в *списке градуировочных точек* появляются строки, содержащие имя файла текущей хроматограммы. Число строк равно числу компонентов, для которых в *Таблице компонентов* в столбце *Пик* указан номер пика на хроматограмме.

*Список градуировочных точек* содержит следующую информацию:

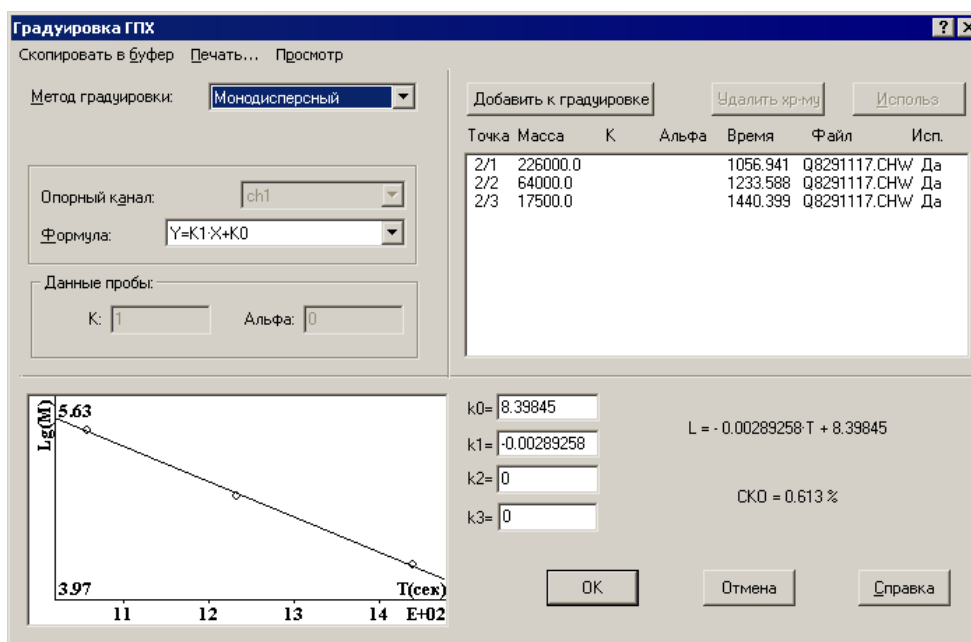
<b>Точка</b>	Номер градуировочной точки, имеющий структуру ( <i>Номер градуировочной хроматограммы/Номер компонента в Таблице компонентов</i> ). Если компонент, указанный в <i>Таблице компонентов</i> , в градуировочном образце отсутствует (в <i>Таблице пиков</i> в столбце <i>Пик</i> стоит значение 0), строка с соответствующим номером в списке градуировочных точек также отсутствует.
<b>Масса</b>	Молекулярная масса, указанная в столбце <i>Мол.масса Таблицы компонентов</i>
<b>K</b>	Параметры фракций градуировочного образца, указанные в соответствующих столбцах <i>Таблицы компонентов</i> (для метода <i>Монодисперсный</i> эти столбцы в списке градуировочных точек не заполняются).
<b>Альфа</b>	
<b>Время</b>	Время удерживания компонента, измеренное по его пику на указанной градуировочной хроматограмме.
<b>Файл</b>	Имя файла градуировочной хроматограммы.
<b>Исп.</b>	Признак использования данной точки при расчете градуировочной зависимости. Может иметь значения <i>Да</i> или <i>Нет</i> .

После нажатия кнопки **Добавить к градуировке** программа сразу же рассчитывает градуировочную зависимость, используя формулу аппроксимации, установленную в поле **Формула** (по умолчанию  $Y = k1 \cdot X + k0$ ). Результаты расчета представляются в окне в следующем виде:

строится график градуировочной зависимости, на котором знаком  $\circ$  отмечаются точки, использованные при его построении;

в полях  $k_0...k_3$  выводятся значения одноименных коэффициентов;

приводится формула градуировочной зависимости  $L(T)$  и значение среднеквадратичного отклонения **СКО** экспериментальных точек от расчетных значений.



- Оцените полученный результат визуально по графику или по величине **СКО**.
- Если какая-либо точка заметно выпадает из общего ряда, исключите ее, выделив соответствующую строку в списке градуировочных точек и щелкнув мышью по кнопке **Используй**. При этом в последнем столбце списка слово *Да* заменится на слово *Нет*, точка будет отмечена на графике знаком  $\star$ , будет выполнен пересчет коэффициентов и построение нового графика. Повторное выполнение той же процедуры вновь включает точку в число используемых. Исключить можно любое количество точек.
- Если требуется, выберите оптимальный вариант аппроксимирующей зависимости, изменяя значения в списочном поле **Формула**. При этом все изменения результатов расчетов будут отражаться в окне в виде изменения значений параметров и вида графика.

Для получения градуировки с помощью метода *Монодисперсный* достаточно одной градуировочной хроматограммы. Однако также предусмотрена возможность использования для одной градуировки и хроматограмм нескольких образцов, которые могут содержать как одни и те же, так и различные монодисперсные фракции. В первом случае повышается статистическая достоверность получаемой градуировки, во втором – также расширяется диапазон определяемых молекулярных масс и/или добавляются данные для наилучшего выбора аппроксимирующей функции. Процедура добавления данных для градуировки описана в разделе **Добавление и удаление градуировочных хроматограмм**.

#### Метод Полидисперсный

При выборе этого метода в окне **Градуировка ГПХ** происходят следующие изменения: списочное поле **Формула** блокируется, так как возможно использование только линейной аппроксимации; область **Данные пробы** заменяется областью **Параметры градуировки** с полями **Mn** и **Mw**. После нажатия кнопки **Добавить к градуировке** эти поля становятся доступными для ввода данных, а в списке градуировочных точек появляется единственная строка, содержащая имя файла текущей хроматограммы. Далее для расчета градуировочной зависимости необходимо выполнить следующее.

- Введите в поля **Mn** и **Mw** в области **Параметры градуировки** соответствующие параметры градуировочного образца.
- Щелкните мышью по любому полю кроме того, в которое были введены последние данные. Программа произведет расчет градуировочных коэффициентов  $k_1$  и  $k_0$ , которые будут представлены в одноименных полях. В окне также появятся формула и график градуировочной зависимости.

При получении градуировки с помощью метода *Полидисперсный* возможно использовать только одну градуировочную хроматограмму.


### **Метод Универсальный**

После выбора в списочном поле **Метод** значения *Универсальный* поля **К** и **Альфа** становятся доступными для ввода данных, кроме того, изменяется величина, представляемая на графике по координате  $Y: \lg(M)$  заменяется величиной  $\lg([v]M)$ . Дальнейший порядок действий зависит от того, полностью ли была создана *Таблица компонентов*.

- Если *Таблица компонентов* создана, все дальнейшие процедуры выполняются так же, как для метода *Монодисперсный* (см. выше). Единственное отличие состоит в том, что в списке градуировочных точек вводятся данные также в столбцы *К* и **К** и *Альфа*.
- Если *Таблица компонентов* содержит только одну строку, выполните следующее.
  - ♦ Введите в поля **К** и **Альфа** значения, соответствующие большинству монодисперсных фракций используемого образца, и нажмите кнопку **ОК**. Произойдет возврат в *Таблицу компонентов*.
  - ♦ Завершите создание *Таблицы компонентов*, как это описано выше в разделе **Создание таблицы компонентов**.
  - ♦ Вернитесь в окно **Градуировка ГПХ** и нажмите кнопку **Добавить к градуировке**. Программа выполнит расчет градуировочной зависимости.
  - ♦ Если требуется, внесите необходимые коррективы, как это описано в разделе **Метод Монодисперсный**.

При получении градуировки с помощью метода *Универсальный* возможно использовать как одну, так и несколько градуировочных хроматограмм аналогично методу *Монодисперсный*.

### **Завершение градуировки и запись метода**

- После завершения всех операций в окне **Градуировка ГПХ** нажмите кнопку **ОК**. Произойдет возврат в *Таблицу компонентов*.
- Нажмите кнопку **ОК**, *Таблица компонентов* закроется.
- Для того чтобы в дальнейшем при использовании создаваемого метода получать отчеты в требуемом виде, откройте окно **Опции отчета**, нажав кнопку , и выполните необходимые настройки (см. раздел **Особенности отчетов для ГПХ**).
- Выберите команду **Файл/Сохранить/Метод** и запишите файл метода под новым именем.
- Закройте хроматограмму, сохранив внесенные изменения.

### **Печать результатов градуировки**

Результаты градуировки могут быть распечатаны непосредственно из окна **Градуировка ГПХ** независимо от отчета для конкретной хроматограммы. Кроме того, отдельно может быть скопирован в буфер для вставки в другой файл график градуировочной зависимости. Команды, необходимые для выполнения этих операций, включены в меню, расположенное под заголовком окна. Печать результатов градуировки производится с использованием установок, сделанных в окне **Опции отчета** (см. выше).

- Для предварительного просмотра результатов градуировки, выводимых на печать, выберите команду **Просмотр**. Откроется окно **Просмотр** (см. **РП: Отчет**, раздел **Вывод на принтер**).
- Для печати отчета выберите команду **Печать**. При этом откроется стандартное окно системы *Windows* для печати (**Печать** или **Print** для русско- или англоязычной версии *Windows* соответственно). Все процедуры в этом окне выполняются по общим правилам работы в *Windows* (см. там же).
- Для копирования рисунка в буфер выберите команду **Скопировать в буфер**.

## Определение ММР

Для определения ММР исследуемого образца выполните следующее.

- Откройте ранее созданный метод ГПХ, содержащий градуировку, или хроматограмму, полученную с использованием такого метода.
- Запустите сбор данных и получите новую хроматограмму (см. *РП: Руководство для начинающих, Этапы 2, 4*).
- Убедитесь, что на участках хроматограммы, выделенных для определения начального и конечного значения базы, нет случайных пиков или провалов. В случае необходимости измените границы этих участков (см. раздел *Разметка хроматограммы ГПХ*).
- Если при градуировке был использован метод *Универсальный*, введите значения параметров **К** и **Альфа** для исследуемого образца, выполнив следующее.
  - ♦ Откройте окно **Градуировка ГПХ**, выбрав команду **Метод/Градуировка.../Графики** или открыв *Таблицу компонентов* и нажав кнопку **Графики**.
  - ♦ Введите значения **К** и **Альфа** в одноименные поля и нажмите кнопку **ОК**. Если окно **Градуировка ГПХ** было открыто из *Таблицы компонентов*, при ее закрытии также необходимо нажать кнопку **ОК**.
- Получите отчет с параметрами ММР, рассчитанными по хроматограмме, в соответствии со стандартной процедурой получения отчета (см. *РП: Отчет*, раздел *Получение отчета*).

## Добавление и удаление градуировочных хроматограмм

### Добавление данных для образца с исходным набором монодисперсных фракций

Для того чтобы добавить к градуировке данные хроматограммы образца, содержащего *те же* монодисперсные фракции, выполните следующее.

- Получите хроматограмму с использованием метода, содержащего градуировку, к которой производится добавление данных (см. предыдущий раздел).
- Откройте *Таблицу компонентов* и убедитесь в правильности идентификации пиков. Возможны следующие ошибки идентификации:

Пик не найден из-за того, что время выхода пика на текущей хроматограмме отличается от ранее заданного в *Таблице компонентов* больше, чем указано в столбце *Окно*. Для такого компонента в столбце *Пик* стоит значение *0*.

Вместо большого пика идентифицирован соседний маленький пик, случайно имеющий более близкое значение времени удерживания.

- Если идентификация произведена с ошибками, внесите исправление в таблицу, введя в столбец *Пик* номера пиков, соответствующих монодисперсным фракциям.
- Откройте окно **Градуировка ГПХ** и нажмите кнопку **Добавить к градуировке**. Программа добавит необходимое число строк в *список градуировочных точек* с указанием имени файла текущей хроматограммы, нанесет новые точки на график и произведет пересчет градуировочной зависимости.



В списке градуировочных точек указывается фактическое время удерживания, полученное в указанной хроматограмме, то есть, для одного и того же компонента в разных строках могут стоять несколько отличающиеся значения. В *Таблице компонентов* для всех градуировочных хроматограмм сохраняются одни и те же значения времени удерживания, полученные при первой градуировке, если не выполнялась процедура обновления значений (см. *РП: Количественный и качественный анализ*, раздел *Общая настройка алгоритма идентификации компонентов*).

- Оцените полученный результат и произведите, если требуется, корректировку, как это делалось при первоначальном получении градуировочной зависимости (см. раздел *Метод Монодисперсный*).

- Закройте окно **Градуировка ГПХ** и *Таблицу компонентов*, нажав в обоих случаях кнопку **ОК**.
- Сохраните новую градуировку в файле метода, как это описано в разделе **Завершение градуировки и запись метода**.

#### *Добавление данных для образца с измененным набором монодисперсных фракций*

Для того чтобы добавить к градуировке данные хроматограммы образца, содержащего *иной* набор монодисперсных фракций, выполните следующее.


- Получите хроматограмму с использованием метода, содержащего градуировку, к которой производится добавление данных (см. предыдущий раздел).
- Откройте *Таблицу компонентов*. Если программа не найдет пиков, которые можно сопоставить тем или иным компонентам из таблицы, в соответствующих строках в столбце *Пик* будет стоять значение 0. Некоторым компонентам, отсутствующим в текущем образце, могут быть сопоставлены случайные мелкие пики.
- Внесите необходимые изменения в *Таблицу компонентов*.
  - ♦ Исправьте, если требуется, ошибки идентификации для компонентов, ранее включенных в таблицу: в столбец *Пик* введите номер пика на текущей хроматограмме, если соответствующая фракция есть в образце, или 0, если этой фракции в образце нет.
  - ♦ Добавьте необходимое число строк для новых фракций, нажимая кнопку **Добавить**, и введите для них значения в столбец *Мол.вес* (для метода *Универсальный*, при необходимости, отредактируйте также значения *K* и *Альфа*).
- Откройте окно **Градуировка ГПХ** и далее выполните все процедуры, описанные в предыдущем разделе.

#### *Объединение нескольких независимо полученных хроматограмм*


Градуировочная зависимость может быть построена на основе данных нескольких независимо полученных хроматограмм. Этот способ особенно удобно использовать в случае, когда в разных хроматограммах вообще нет пиков одних и тех же фракций, в частности, если для каждой фракции получена отдельная хроматограмма.

Для построения градуировочной зависимости выполните следующее.

- Откройте все хроматограммы и расположите их на экране так, чтобы они все были одновременно видны, с помощью команды **Окно/Расположить по вертикали** или **Окно/Расположить по горизонтали**.

 Все хроматограммы должны быть получены с использованием одного и того же метода!

- Выберите какую-либо хроматограмму и выполните следующее.
  - ♦ Откройте окно **Параметры разметки**, задайте в полях **Начало пиков** и **Конец пиков** такие значения, чтобы полученный диапазон перекрывал область пиков для *всех* градуировочных хроматограмм, и нажмите кнопку **ОК**.
  - ♦ Если для этой хроматограммы ранее не была создана **Таблица компонентов**, выполните процедуры, описанные в разделе **Создание таблицы компонентов**.
  - ♦ Если данные этой хроматограммы не были ранее использованы для построения градуировочной зависимости, выполните процедуры, описанные в разделе **Получение градуировочной зависимости**, для метода *Монодисперсный* или *Универсальный*.

 Если в первой хроматограмме содержится только один пик, единственная точка не показывается на графике в окне **Градуировка ГПХ**.

- ♦ Запишите произведенные изменения в файл метода, выбрав команду **Метод/Градуировка/Записать в метод**.
- ♦ Закройте хроматограмму.
- Выберите какую-либо другую хроматограмму и добавьте эти данные для построения градуировочной зависимости, выполнив следующее.
  - ♦ Скопируйте данные из файла метода, выбрав команду **Метод/Градуировка/Прочитать из метода**.
  - ♦ Откройте **Таблицу компонентов** – в ней будут содержаться данные из первой

хроматограммы.

- ◆ Исправьте, если требуется, ошибки идентификации для компонентов, ранее включенных в таблицу, как это описано в предыдущем разделе.
  - ◆ Добавьте строки для пиков фракций, которых не было в предыдущей хроматограмме, и введите для них данные о молекулярных весах.
  - ◆ Откройте окно **Градуировка ГПХ** и далее добавьте текущую хроматограмму к градуировочным, как это описано в разделе **Добавление данных для образца с исходным набором монодисперсных фракций**.
  - ◆ Запишите произведенные изменения в файл метода, выбрав команду **Метод/Градуировка/Записать в метод**.
  - ◆ Закройте хроматограмму.
- Повторите описанную процедуру для всех остальных хроматограмм. В результате в файле метода будет получена полная градуировочная зависимость с использованием данных всех хроматограмм.

#### Удаление градуировочной хроматограммы

Любая градуировочная хроматограмма может быть удалена. Эта операция, в отличие от *исключения точек* (см. раздел **Метод Монодисперсный**) является необратимой, то есть, удаленная градуировочная хроматограмма не может быть тут же восстановлена (кроме случая, когда она является текущей). Для удаления градуировочной хроматограммы выполните следующее.

- Установите курсор на любую строку *списка градуировочных точек*, относящуюся к удаляемой хроматограмме.
- Нажмите кнопку **Удалить хр-му**. При этом появится сообщение, содержащее запрос на подтверждение удаления.
- Нажмите кнопку **Да**. При этом будут удалены все строки с именем удаляемой хроматограммы из списка градуировочных точек и точки с графика, а также выполнен перерасчет градуировочной зависимости. При удалении какой-либо хроматограммы номера всех остальных хроматограмм сохраняются неизменными. Если удаляется текущая хроматограмма, вновь становится активной кнопка **Добавить к градуировке**.




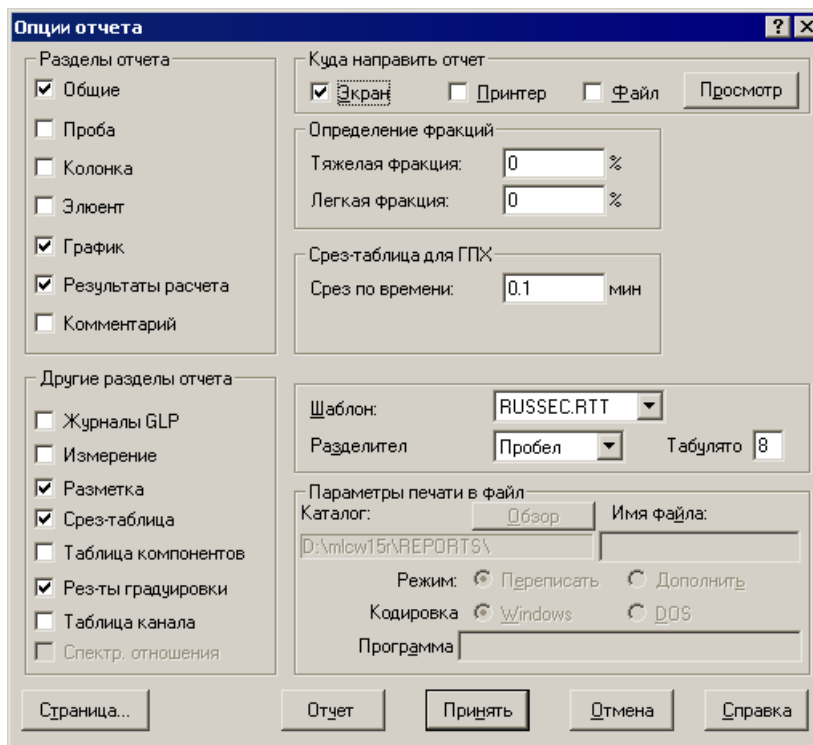
---

## Особенности отчетов для ГПХ

---

### Настройки опций отчета

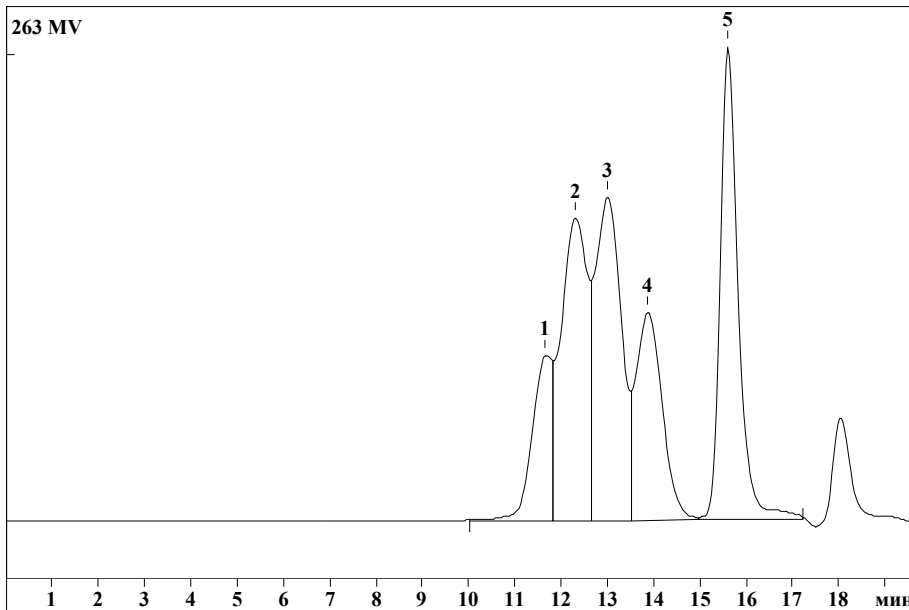
- Откройте окно **Опции отчета**, нажав кнопку  (общую информацию о настройке опций отчета см. **РП: Отчет**).



- В списочном поле **Шаблон** выберите файл *russec.rtt*, который предназначен для создания отчета для хроматограмм ГПХ на русском языке.
- В области **Разделы отчета** установите флажки, соответствующие разделам **График** и **Результаты расчета**, а также любые другие флажки, которые содержат требуемую информацию о хроматографическом процессе.
- Если требуется отдельно определить параметры **Mn** и **Mw** для тяжелой и/или легкой фракции, задайте в области **Определение фракций** долю фракций в % от полной массы (площади под кривой).
- Если требуется получить в отчете таблицу данных *по временным срезам*, выполните следующее.
  - В области **Срез-таблица для ГПХ** введите в поле **Срез по времени** величину временного интервала вывода данных в таблице.
  - В области **Другие разделы** установите флажок **Срез-таблица**.
- В области **Другие разделы** установите, если требуется, флажок **Результаты градуировки**, а также **Разметка**, включающие в отчет разделы со сведениями о градуировке, использованной при расчете ММР, и о разметке текущей хроматограммы ГПХ. Возможна также установка других незаблокированных флажков этой области для включения в отчет информации о параметрах приема данных. Разделы, соответствующие заблокированным флажкам, в отчете печататься не будут, независимо от их установки.
- Нажмите кнопку **Принять**. Окно **Опции отчета** закроется с сохранением всех сделанных установок.

## Вид отчета

Результаты расчета ММР включаются в отчет при установке флажков **График** и **Результаты расчета** в следующем виде:



### РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА ММР

Для образца с  $K = 1.000000$  Альфа = 0.000000

MN: 1089.29

MW: 6456.27

MW/MN: 5.92704 (Индекс полидисперсности)

MZ: 14039.3

MZ+1: 21156.4

MP: 381.551 (Молекулярная масса для наибольшего пика)

MN, тяжелая фракция: 21262.7

MW, тяжелая фракция: 22441.4

MN, легкая фракция: 263.626

MW, легкая фракция: 286.846

При установке соответствующих флажков в области **Другие разделы** в отчет также могут быть включены другие разделы), которые содержат специфическую для ГПХ информацию.

Данные листа **Параметры ГПХ** окна **Параметры разметки** (флажок **Разметка**).

### ИНТЕГРИРОВАНИЕ

Границы интервалов для расчета ММР

Начало базовой линии: 0мин

Конец базовой линии: 20мин

Начало пиков: 10мин

Конец пиков: 20мин

Начало области анализа: 10мин

Конец области анализа: 17.2мин

Данные по временным срезам представляются в таблице, содержащей следующие столбцы: *Время* (среднее значение времени интервала, длительность которого задана в поле **Срез по времени** в окне **Опции отчета**); *Mw* – значение средневзвешенной молекулярной массы для интервала; *M%* – % от общей массы полимера, приходящийся на интервал; *M%, сумма* – % от общей массы, приходящийся на все интервалы, начиная с текущего; *N%* – % от общего числа молекул, приходящийся на интервал; *N%* – % от общего числа молекул, приходящийся на все интервалы, начиная с текущего.

### ТАБЛИЦА ДАННЫХ ПО СРЕЗАМ

№	Время	Mw	M%	M%, сумма	N%	N%, сумма
1	10.24	78296.8	0.048	100.000	0.001	100.000
2	10.74	47567.9	0.230	99.952	0.005	99.999
3	11.24	28899.1	3.429	99.722	0.128	99.994
4	11.74	17557.2	9.666	96.293	0.596	99.866
5	12.24	10666.6	16.033	86.627	1.626	99.270

6	12.74	6480.3	16.054	70.594	2.680	97.644
7	13.24	3937.0	13.110	54.540	3.603	94.964
8	13.74	2391.9	10.509	41.430	4.754	91.361
9	14.24	1453.1	5.329	30.920	3.968	86.607
10	14.74	882.8	0.425	25.592	0.521	82.639
11	15.24	536.3	5.731	25.166	11.560	82.118
12	15.74	325.8	17.476	19.436	58.026	70.558
13	16.24	198.0	1.444	1.960	7.891	12.532
14	16.74	120.3	0.516	0.516	4.641	4.641

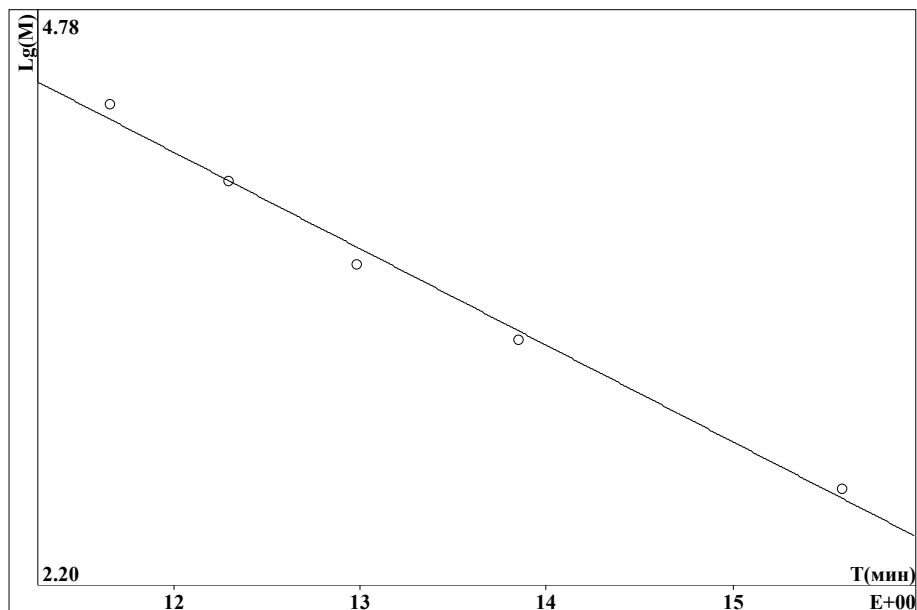
Градуировочные данные, соответствующие информации, представленной в окне **Градуировка ГПХ**.

ГРАДУИРОВКА ДЛЯ ГПХ АНАЛИЗА:

Метод градуировки: Монодисперсный

Градуировочная зависимость:  $L = - 0.43286 \cdot T + 9.32695$

СКО: 1.897 %



K3 = 0.000000  
 K2 = 0.000000  
 K1 = -0.432860  
 K0 = 9.326947

Мол.Масса	K	Альфа	Хр-ма	Время
22300.0	0.000000	0.000000	1	11.6579
10100.0	0.000000	0.000000	1	12.2939
4300.0	0.000000	0.000000	1	12.9792
1960.0	0.000000	0.000000	1	13.8541
423.0	0.000000	0.000000	1	15.5876

Градуировочные хроматограммы:

Хр-ма Файл  
 1 K2011206.CHW

---

## Предметный указатель

Базовая линия	5	Квант времени	4
ГПХ		Методы градуировки	
особенности отчетов	15	выбор метода	9
особенности применения системы	4	<i>Монодисперсный</i>	7, 8, 9, 12
переход к	5, 7	<i>Полидисперсный</i>	7, 8, 10
Градуировка		<i>Универсальный</i>	7, 8, 11, 12
особенности для ГПХ	4	Молекулярно-массовое распределение (ММР)	
печать результатов	11	определение для образца	12
Градуировочная зависимость		формулы для расчета	4
аппроксимация	3, 9	Область анализа	4, 5
добавление градуировочных хроматограмм	12	Отчеты	
оптимизация	10	представление информации	15
удаление градуировочных хроматограмм	14	установка опций	15
Градуировочные точки	4	Разметка	5, 7
исключение	10	Список градуировочных точек	9
список	9, 12	Срез-таблица	15, 16
Градуировочные хроматограммы	4, 9	Срез-таблица компонентов	7, 12
добавление	12	Таблица по временным срезам	15, 16
удаление	14	Формулы для расчета ММР	4