

УДК 543.544:544.77

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ФАКТОРА УДЕРЖИВАНИЯ В МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2005 А.П. Бойченко, А.Л. Иващенко*

Статья посвящена проблемам, связанным с оценкой адекватности моделей в мицеллярной жидкостной хроматографии. Приведен обзор моделируемых функций фактора удерживания в высокоэффективной жидкостной хроматографии и мицеллярной жидкостной хроматографии. Методом однофакторного дисперсионного анализа изучены воспроизводимость и сходимость факторов удерживания четырех эфиров *l*-гидроксibenзойной кислоты и семи полиароматических углеводородов в мицеллярной жидкостной хроматографии. Впервые построены скедастические зависимости для фактора удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии. Скедастические кривые оказались нисходящими в случае эфиров *l*-гидроксibenзойной кислоты и восходящими в случае полиароматических углеводородов. Воспроизводимость и сходимость фактора удерживания полиароматических углеводородов выше, чем в случае эфиров *l*-гидроксibenзойной кислоты. Скедастические зависимости позволяют вводить статистические веса при моделировании в мицеллярной жидкостной хроматографии, например $w_{1/k} = \frac{k^4}{s_k^2}$ и $w_{\log k} = \frac{k^2}{0.434s_k^2}$ для гиперболической и логарифмической функций фактора удерживания.

тографии, например $w_{1/k} = \frac{k^4}{s_k^2}$ и $w_{\log k} = \frac{k^2}{0.434s_k^2}$ для гиперболической и логарифмической функций фактора удерживания.

1. Введение

Модели хроматографического удерживания составляют основу оптимизации условий хроматографирования и управления процессами разделения, поэтому понятен интерес исследователей к совершенствованию математического моделирования и поиску новых моделей, как физико-химических (содержательных), так и эмпирических. В некоторых случаях последние также позволяют выявить новые закономерности удерживания.

Обычно при сопоставлении и оценке качества разных моделей принимают во внимание близость коэффициента корреляции к 1, значения остаточной суммы квадратов или модулей невязок фактора удерживания, а также относительные значения остаточных сумм. При этом возникает ряд проблем: (1) значение коэффициента корреляции всегда приближается к 1 при уменьшении числа степеней свободы [1]; (2) значения остаточных сумм вообще не зависят от числа степеней свободы; (3) хорошая адекватность или точность описания экспериментальных данных еще не гарантирует высокой предсказательной способности модели [2]. Обычно хорошего качества описания удается достичь, добавляя в модель новые параметры. При этом, однако, снижается предсказательная способность модели [3], что влияет на результаты оптимизации.

Известные описания влияния состава элюента на фактор удерживания (*k*) в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) базируются на различных исходных моделях хроматографического процесса. В обращено-фазовой ВЭЖХ итоговые уравнения представляют собой линейные зависимости разных функций фактора удерживания от функций объемной доли (φ) или концентрации (*C*) органического растворителя, а именно: а) зависимость $\ln k$ от φ и φ^2 (П. Яндера, [4-6]); б) зависимость $\log k$ от $\log C$ (Ф. Мураками, [7]), в) зависимость $1/k$ от φ и $\ln \varphi$ [8]. В нормально-фазовой ВЭЖХ используются зависимости разных функций фактора удерживания от содержания более полярного компонента (*B*) бинарного элюента: а) зависимость $\log k$ от $\log N_B$, где N_B — мольная доля компонента *B* (уравнение Снайдер-Сочевиньского [9, 10]), б) зависимость $1/k$ от концентрации компонента *B* (уравнение Скотта-Кучеры [5]).

В мицеллярной жидкостной хроматографии (МЖХ) основной содержательной моделью является трехфазная модель Армстронга-Нома, из которой следует зависимость величины $1/k$ от концентрации поверхностно-активного вещества (ПАВ) в мицеллярном элюенте [11-14], а для гибридных мицеллярных элюентов — от концентрации ПАВ и объемной доли φ растворителя-

*АО «Стома», г. Харьков, ул. Ньютона, 3, 61105. Испытательная аналитическая лаборатория

модификатора [15]. Недавно предложена содержательная модель удерживания в МЖХ на основе квазихимической концепции мицеллообразования (модель изменения микроокружения сорбата, [16-18]), из которой следует линейная зависимость $\log k$ от $\log c_R$ и $\log c_S$ (c_R – концентрация растворителя-модификатора, c_S – концентрация ПАВ в гибридном мицеллярном элюенте). Наряду с этим в качестве описывающих функций в МЖХ используются эмпирические уравнения, отражающие полиномиальные зависимости $1/k$ или $\log k$ от концентрации ПАВ и объемной доли φ растворителя-модификатора [15].

Второй подход к моделированию удерживания в ВЭЖХ состоит в построении зависимостей «удерживание-свойство» и «удерживание-строение» на основе аддитивных схем, связывающих $\log k$ и набор дескрипторов [5, 19-26]. Практический интерес представляют модели, в которых значения $\log k$ связывают с гидрофобностью веществ [27-30] или биологической активностью [21, 30-40].

Использование разных функций фактора удерживания (k , $1/k$, $\log k$) с неизвестным характером распределения погрешностей осложняет сопоставление качества разных моделей. Ключевой проблемой как в МЖХ, так и в ВЭЖХ в целом является отсутствие данных о погрешностях измерения основной моделируемой величины – фактора удерживания.

Изучение воспроизводимости характеристик удерживания в МЖХ представлено чуть ли не единственной работой [41], в которой М. Халеди и Ш. Янг приводят значения времен удерживания, полученные при параллельных анализах сульфаниламидных препаратов в течение одного дня. Авторы делают вывод о высокой воспроизводимости и сходимости характеристик удерживания в МЖХ, однако ни способ организации параллельных опытов, ни факторы, влияющие на погрешность времен удерживания, ни сам статистический анализ в публикации не приведены. Немногочисленны и публикации о воспроизводимости времен удерживания в ОФ ВЭЖХ [42, 43].

Более детально воспроизводимость характеристик удерживания изучена в газовой хроматографии (ГХ) [44-47]. Это связано с широким использованием индексов удерживания для идентификации пиков и поиском адекватных критериев их совпадения. Отсутствие подобных работ в жидкостной хроматографии может объясняться как большим вниманием к тем характеристикам пиков (высота, площадь), которые используют для количественного определения, так и нежеланием увеличивать число параллельных определений с расходом реагентов особой чистоты.

Цель настоящей работы — экспериментальное оценивание погрешностей фактора удерживания в одной из разновидностей высокоэффективной жидкостной хроматографии — мицеллярной жидкостной хроматографии.

2. Экспериментальная часть

2.1 Аппаратура

Жидкостный хроматограф Shimadzu LC 10 AVP (Shimadzu corp., Analytical instruments division, Japan, Kyoto) со спектрофотометрическим детектором (SPD-10A VP). Ввод пробы проводился при помощи шестиходового крана, петля-дозатор 5 мкл (Rheodyne, USA). При приготовлении подвижных фаз и стандартных растворов использовалась мерная посуда I-го класса точности, одинаковая во всех экспериментах.

2.2 Реагенты

n-Гидроксibenзойная кислота (ГБК), ее эфиры (метиловый, этиловый, пропиловый, бутиловый); бензол и полиароматические углеводороды (ПАУ: нафталин, аценафтен, фенантрен, флуорантен, хризен, бенз(а)пирен), «х.ч.». Додецилсульфат натрия (SDS) фирмы Fluka (Buchs, Switzerland), *n*-бутанол, тетрагидрофуран «для ВЭЖХ» фирмы Merck, спирт этиловый, ректифицированный в соответствии с ДСТУ 4224. Во всех экспериментах использовалась бидистиллированная вода.

2.3 Условия хроматографирования

Все разделения выполнены на колонке Kromasil C18, 150×2.0 мм, 5 мкм (Column Engineering Inc., USA), термостатированной при 40 °С. Стандартный раствор эфиров *n*-гидроксibenзойной

кислоты (0.01 г/л) готовили растворением навесок в этиловом спирте с последующим разбавлением подвижной фазой. Стандартный раствор ПАУ (1.3 г/л бензола, 0.07 г/л нафталина, 0.16 г/л аценафтена, 0.006 г/л фенантрена, 0.03 г/л флуорантена, 0.01 г/л хризена, 0.005 г/л бенз(а)пирена) готовили растворением навесок ПАУ в тетрагидрофуране с последующим разбавлением в растворе тетрагидрофуран — 0.1 М раствор SDS в соотношении объемов 1:1. Изократическое разделение проводили при скорости подвижной фазы 0.2 мл/мин. Объем вводимой пробы составлял 5 мкл во всех экспериментах. Детектирование проводилось при 254 нм. Мертвое время определяли в каждом эксперименте отдельно по пику *n*-гидроксибензойной кислоты (0.020 г/л).

При разделении эфиров *n*-гидроксибензойной кислоты в качестве подвижной фазы использовали мицеллярный раствор с молярной концентрацией SDS 0.097 М и объемной долей *n*-бутанола 3 %, а при разделении ПАУ — мицеллярный раствор с молярной концентрацией SDS 0.1 М и объемной долей *n*-бутанола 15 %. При исследовании воспроизводимости результатов, полученных в разные дни (*interday*), колонку в конце дня промывали смесью ацетонитрил-вода в объемном соотношении 33:67. В начале дня через колонку пропускали мицеллярный элюент в течение 30-40 мин (перед разделением эфиров *n*-гидроксибензойной кислоты) или 40-50 мин. (перед разделением ПАУ); между сериями измерений колонку промывали применяемым мицеллярным элюентом в течение 20 мин и 30 мин соответственно. Во всех экспериментах время между вводами пробы составляло 20 мин для эфиров ГБК и 40 мин для ПАУ.

Серией считали совокупность результатов, полученных с использованием отдельных порций однажды приготовленного раствора элюента. При переходе к новой серии измерений повторяли приготовление раствора элюента.

Примеры полученных хроматограмм для эфиров *n*-гидроксибензойной кислоты и полиароматических углеводородов представлены на рисунках 1 и 2.

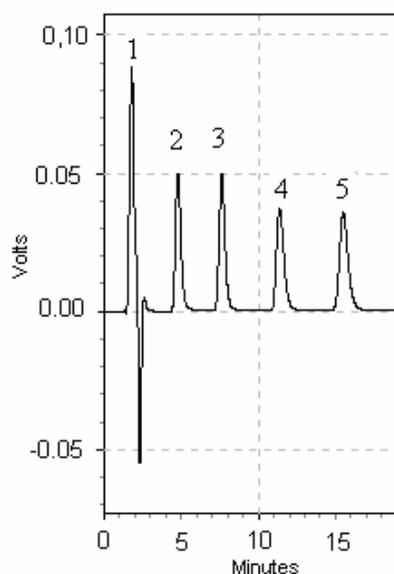


Рис. 1. Типичная хроматограмма смеси эфиров ГБК.

- 1 – *n*-гидроксибензойная кислота,
- 2 – метиловый эфир ГБК (Me-paraben),
- 3 – этиловый эфир ГБК (Et-paraben),
- 4 – пропиловый эфир ГБК (Pr-paraben),
- 5 – бутиловый эфир ГБК (Bu-paraben).

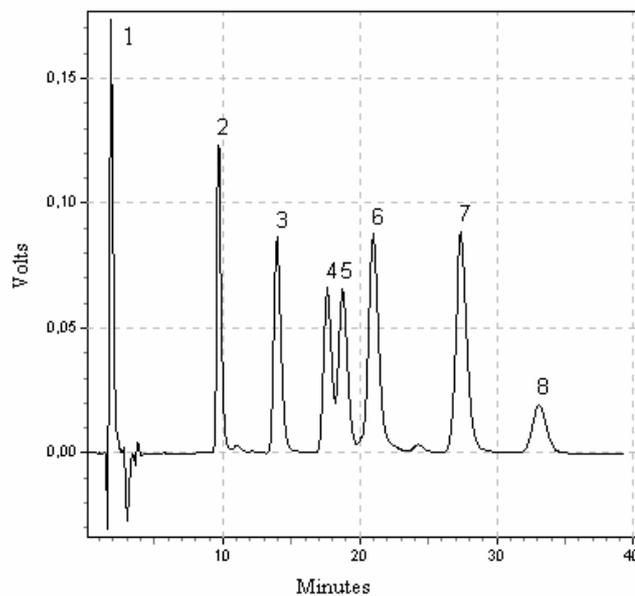


Рис. 2. Типичная хроматограмма смеси ПАУ.

- 1 – *n*-гидроксибензойная кислота, 2 – бензол,
- 3 – нафталин, 4 – аценафтен,
- 5 – фенантрен, 6 – флуорантен,
- 7 – хризен, 8 – бенз(а)пирен.

2.4 Программное обеспечение и базы данных

Для всех расчетов в работе использовались Statistica 6.0, data analysis software system (2004, <http://www.statsoft.com>) и Microsoft Excel (2002, Microsoft, <http://office.microsoft.com>).

3. Результаты и обсуждение

3.1 Проблема обнаружения выбросов.

Обычно анализ данных принято начинать с выявления и исключения аномальных наблюдений (резко выделяющихся результатов, выбросов, грубых промахов), поскольку даже единственный выброс может привести к грубым ошибкам при проверке статистических гипотез [50] и смещению оценок выборочных параметров [51, 52]. Критерии для исключения резко выделяющихся наблюдений приведены в таблицах по математической статистике [53, 54] и специальной химической литературе, посвященной обработке и представлению результатов химического анализа [49, 51, 55, 56]. Эти критерии основаны на предположении о нормальном распределении генеральной совокупности, из которой получены выборки, и их применение полностью корректно только при выполнении этого условия. К робастным, т.е. устойчивым к нарушению основных предположений методам проверки относится *MAD*-тест (median absolute deviation) [57].

В предварительном анализе полученных нами экспериментальных данных были использованы как разные параметрические критерии, так и непараметрический тест. Однако при этом получались противоречивые выводы о наличии выбросов; на такую возможность указывается и в работах [57, 58]. Для дальнейшего анализа использовался весь массив экспериментальных данных. От исключения подозрительных результатов отказались, поскольку не было оснований предполагать, что они получены: (1) при неправильной записи результатов человеком или прибором, (2) при нарушении условий проведения эксперимента [57].

3.2 Дисперсионный анализ

Характеристики воспроизводимости фактора удерживания изучали с помощью однофакторного дисперсионного анализа [43, 44, 47-49, 56, 58] на основе модели:

$$Y_{i,j} = \mu + A_i + \varepsilon_{ij}, \quad (1)$$

где Y_{ij} – результат единичного измерения, μ – математическое ожидание генеральной совокупности; A_i – погрешность, обусловленная отклонением среднего результата серии от общего среднего; ε_{ij} – случайная погрешность, обусловленная влиянием неконтролируемых факторов внутри серий. Погрешностям A_i и ε_{ij} соответствуют дисперсии σ_A^2 и σ_ε^2 , оценками этих дисперсий являются s_A^2 и s_ε^2 соответственно. Эти оценки связаны между собой приближенным равенством:

$$s_A^2 = ns_T^2 + s_\varepsilon^2, \quad (2)$$

где s_A^2 – дисперсия, характеризующая наложение разброса внутри и между сериями; s_T^2 – дисперсия, обусловленная влиянием изучаемого фактора; n – число наблюдений в группах,

если они равны, и выражается как $n = \frac{(\sum_{i=1}^n n_i)^2 - \sum_{i=1}^n n_i^2}{(m-1)\sum_{i=1}^n n_i}$ при их неравенстве. Следует отметить,

что в ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 [59] это выражение приведено с ошибкой.

Эксперимент был спланирован специально для выполнения условий применимости дисперсионного анализа [47, 50, 55, 59, 60]. Применяя параметрический *F*-критерий и критерий Бартлетта для сопоставления дисперсий, учитывали, что *F*-критерий чувствителен к появлению больших отклонений, обусловленных более длинными «хвостами» распределения изучаемой величины, а критерий Бартлетта может с большей вероятностью отвергнуть гипотезу о равенстве дисперсий, если часть совокупности, из которой получены выборки, имеет распределение, отличающееся от нормального [50, 54].

3.3 Воспроизводимость удерживания эфиров *n*-гидроксibenзойной кислоты

При разделении эфиров ГБК было получено 5 серий измерений; серии 1-3 выполнены в один день, серия 4 во второй день, серия 5 в третий. Разброс средних внутрисерийных значений фактора удерживания относительно их общего среднего, \bar{k} , представлен на рисунке 3. Анализ данных по критериям Фишера и Бартлетта показал, что внутрисерийные дисперсии для серий,

полученных в течение дня, не отличаются при 5 % уровне значимости (табл. 1). При равенстве дисперсий внутри серий дисперсия между сериями в течение одного дня незначимо отличается от внутрисерийной (табл. 2), на этом основании была рассчитана объединенная дисперсия серий 1-3.

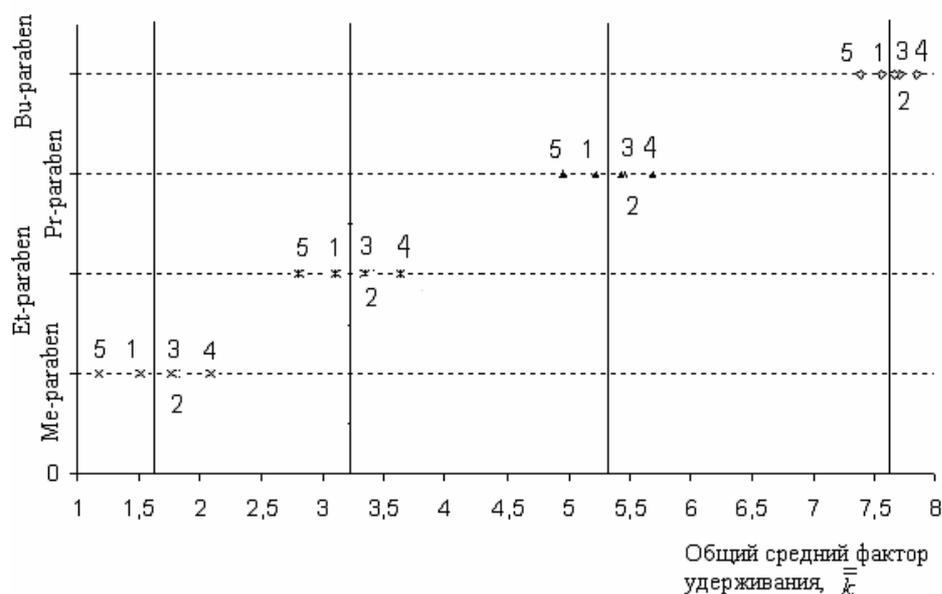


Рис. 3. Разброс средних внутрисерийных значений фактора удерживания для эфиров ГБК (1, 2, 3, 4, 5 – номера серий).

Таблица 1. Сопоставление внутрисерийных дисперсий фактора удерживания при разделении эфиров ГБК

Эфир	<i>i</i>	<i>j</i>	Критерий Бартлетта ($\chi^2_{теор.}=5.99$)	f_i	f_j	$F_{экс.}$	$F_{табл}(f_i; f_j)$
Me-paraben	2	1	2.19	4	2	3.48	19.25
	3	1		5	2	8.00	19.30
	3	2		5	4	2.30	6.26
Et-paraben	2	1	2.19	4	2	4.69	19.25
	3	1		5	2	9.57	19.30
	3	2		5	4	2.04	6.26
Pr-paraben	2	1	2.68	4	2	6.65	19.25
	3	1		5	2	12.54	19.30
	3	2		5	4	1.89	6.26
Bu-paraben	2	1	1.19	4	2	4.75	19.25
	3	1		5	2	4.46	19.30
	2	3		4	5	1.10	5.20

i – номер серии с большим значением дисперсии; *j* – номер серии с меньшим значением дисперсии.

Таблица 2. Дисперсионный анализ *intraday*-результатов при разделении эфиров ГБК

	Me	Et	Pr	Bu
Дисперсия внутри серий 1-3	0.024	0.020	0.017	0.005
Дисперсия между сериями 1-3	0.088	0.080	0.056	0.020
F-критерий ($F_{\text{табл.}}=3.98$)	3.70	3.83	3.41	4.07

Intraday дисперсии серий 1-3, 4 и 5 не отличались при 1 % уровне значимости для всех эфиров ГБК и при 5 % уровне значимости для этилового, пропилового и бутилового эфиров ГБК (табл. 3). Оказалось, что *interday* дисперсия значимо отличается от дисперсии *intraday*, что свидетельствует о наличии влияющего фактора, меняющегося во времени (табл. 4). Скедастические зависимости *intraday* дисперсии и дисперсии s^2_T , обусловленной влияющим фактором, от значений фактора удерживания представлены на рис. 3 и 4.

Таблица 3. Сопоставление *interday* дисперсий фактора удерживания при разделении эфиров ГБК

	i	j	Критерий Бартлетта, χ^2 ($\chi^2_{\text{теор.}}=5.99$)	f_i	f_j	$F_{\text{эксп.}}$	$F_{\text{табл.}}(f_i;f_j)$
Me-paraben	4	5		7.64	10	7	16.96
	1	4	7		12	4.69	1.38
	1	5	10		12	9.20	6.31
Et-paraben	4	5	1.62	10	7	15.00	2.15
	1	4		7	12	4.44	1.46
	1	5		10	12	8.66	3.09
Pr-paraben	4	5	1.51	10	7	14.00	1.09
	1	4		10	12	4.62	1.76
	1	5		10	12	8.06	1.92
Bu-paraben	5	4	0.12	7	10	11.85	1.28
	1	4		7	12	5.33	1.19
	5	1		12	10	7.68	1.08

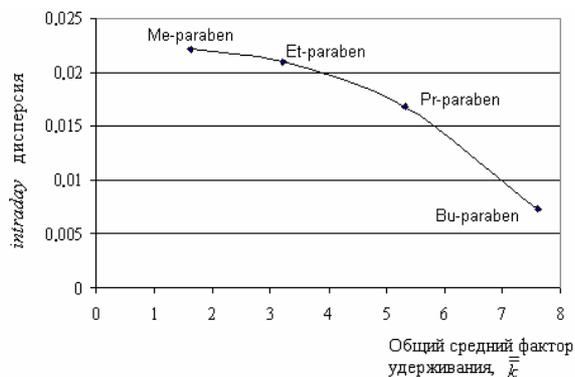


Рис. 3. Скедастическая зависимость *intraday* дисперсии фактора удерживания для эфиров ГБК

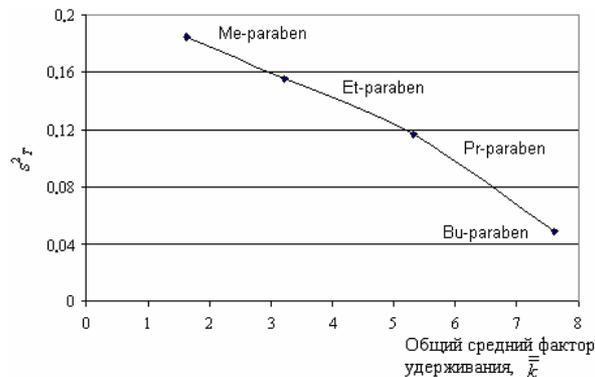


Рис. 4. Скедастическая зависимость s^2_T дисперсии фактора удерживания для эфиров ГБК.

Таблица 4. Дисперсионный анализ *interday*-результатов при разделении эфиров ГБК

	Me-paraben	Et-paraben	Pr-paraben	Bu-paraben
Дисперсия <i>intraday</i>	0.022	0.021	0.017	0.007
Дисперсия <i>interday</i>	2.00	1.69	1.27	0.53
F-критерий ($F_{\text{табл.}}=3.32$)	91	80	76	72
s_T^2	0.18	0.16	0.12	0.05

3.4 Воспроизводимость удерживания полиароматических углеводов.

При разделении ПАУ было получено 3 серии измерений, серия 1 в первый день, серии 2 и 3 во второй день. Оказалось, что в пределах серии времена удерживания для ряда ПАУ и мертвое время для серий 1 и 3 воспроизводятся в пределах минимального различия, регистрируемого прибором, равного 0.008. Обычный способ расчета дисперсии внутри серии приводил к заниженным оценкам. Поэтому использовали правило распространения погрешностей

$s^2 \cong \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 s_{x_i}^2$, согласно которому дисперсия фактора удерживания приблизительно равна:

$s_k^2 \cong \left(\frac{1}{t_0} \right)^2 s_{t_R}^2 + \frac{t_R^2}{t_0^4} s_{t_0}^2$, где t_R — время удерживания компонента, t_0 — мертвое время удерживания,

$s_{t_R} = s_{t_0} = 0.004$. Такое значение стандартного отклонения времени удерживания выбрано из предположения равновероятного появления положительных и отрицательных отклонений относительного среднего. Полученные оценки выборочных дисперсий для трех серий эксперимента приведены в табл. 5; они оказались однородными в соответствии с критерием Бартлетта при уровне значимости 5 % (табл. 6).

Таблица 5. Значения внутрисерийной дисперсии фактора удерживания при разделении ПАУ

	Бензол	Нафталин	Аценафтен	Фенантрен	Флуорантен	Хризен	Бенз(а)пирен
Серия 1	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$7.2 \cdot 10^{-4}$	$4.8 \cdot 10^{-4}$	$5.4 \cdot 10^{-4}$	$6.8 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$1.7 \cdot 10^{-3}$
Серия 2	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$2.3 \cdot 10^{-4}$	$3.8 \cdot 10^{-4}$	$4.8 \cdot 10^{-4}$	$5.7 \cdot 10^{-4}$	$9.1 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^{-3}$
Серия 3	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$3.0 \cdot 10^{-4}$	$4.8 \cdot 10^{-4}$	$5.5 \cdot 10^{-4}$	$6.9 \cdot 10^{-4}$	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$1.7 \cdot 10^{-3}$

Таблица 6. Проверка однородности внутрисерийных дисперсий фактора удерживания при разделении ПАУ

	Бензол	Нафталин	Аценафтен	Фенантрен	Флуорантен	Хризен	Бенз(а)пирен
χ^2 $\chi_{\alpha=0.05}^2 = 5.99$	0.00	1.20	0.06	0.02	0.04	0.06	0.08
F-критерий ($F_{\text{табл.}}=9.12$, серия 3/серия 2)	1.00	0.78	0.79	0.87	0.84	0.77	0.74

При анализе смеси ПАУ не удастся получить более двух серий измерений в течение дня, поскольку время удерживания последнего компонента составляет около 30 минут. Поэтому провести достаточно строгое исследование *intraday* и *interday* дисперсий не представляется воз-

возможным. Во всяком случае, очевидно, что дисперсии фактора удерживания ПАУ существенно ниже, чем в случае эфиров ГБК. По-видимому, это связано со спецификой используемой подвижной фазы, поскольку лучшая сходимость при анализе ПАУ (по сравнению с эфирами ГБК) наблюдается не только для времен удерживания разделяемых компонентов, но и для мертвого времени удерживания, определяемого по одному и тому же компоненту (ГБК). Скедастические зависимости для ПАУ представлены на рис. 4, 5.

Высокая сходимость результатов внутри серий позволила в случае ПАУ выявить влияние межсерийного фактора, усиливающегося с увеличением удерживания компонента (таблица 7).

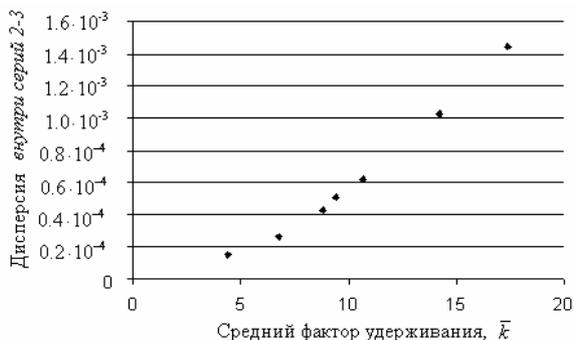


Рис. 5. Скедастическая зависимость дисперсии фактора удерживания внутри серий 2-3 при разделении ПАУ.

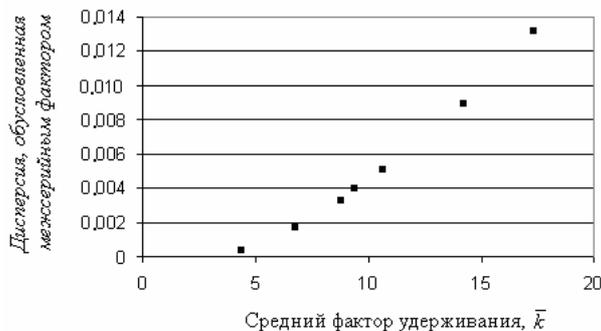


Рис. 6. Скедастическая зависимость дисперсии фактора удерживания ПАУ, обусловленной межсерийным фактором.

Таблица 7. Дисперсионный анализ результатов хроматографирования ПАУ.

	Бензол	Нафталин	Аценафтен	Фенантрен	Флуорантен	Хризен	Бенз(а)пирен
Дисперсия внутри серий 2-3	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$2.6 \cdot 10^{-4}$	$4.2 \cdot 10^{-3}$	$5.1 \cdot 10^{-4}$	$6.3 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$
Дисперсия между сериями 2-3	$2.0 \cdot 10^{-3}$	$7.9 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$1.8 \cdot 10^{-2}$	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$4.1 \cdot 10^{-2}$	$6.0 \cdot 10^{-2}$
F-критерий ($F_{\text{табл.}}=5.59$)	23	59	69	65	70	76	81
Дисперсия, обусловленная межсерийным фактором	$4.4 \cdot 10^{-4}$	$1.7 \cdot 10^{-3}$	$3.3 \cdot 10^{-3}$	$4.0 \cdot 10^{-3}$	$5.1 \cdot 10^{-3}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$	$1.3 \cdot 10^{-2}$

Логично предположить, что оба влияющих фактора, как межсерийный, так и междневной, имеют одинаковую природу и связаны с изменениями в состоянии стационарной фазы, достигаемом при динамическом модифицировании неподвижной фазы (октадецилсиликагель) гибридным мицеллярным элюентом. Имеющиеся наблюдения за сходимостью значений мертвого времени позволяют утверждать, что условия динамической модификации неподвижной фазы стабилизируются при увеличении доли органического модификатора в гибридном элюенте.

При разделении ПАУ значения дисперсии внутри серий и межсерийной дисперсии увеличиваются с ростом значений фактора удерживания (рис. 5, 6), что можно объяснить уширением пиков и, следовательно, увеличением неопределенности в локализации максимума для наиболее удерживаемых компонентов. При разделении эфиров ГБК наблюдается противоположный тренд скедастических зависимостей: с ростом значений фактора удерживания дисперсии *intraday* и s^2_T не увеличиваются, а уменьшаются (рис. 3, 4). Этот факт, как и более высокие значения дисперсий внутри серий, может быть связан как со спецификой разделяемых компонентов, так и с различием состава подвижных фаз при разделении ПАУ и эфиров ГБК. Во всяком случае, очевидно, что характер скедастических зависимостей может быть установлен из

одной серии эксперимента, поскольку в каждой группе веществ вид зависимости одинаков для всех составляющих погрешности.

4. Выводы

Впервые получены скедастические зависимости фактора удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии для четырех эфиров *n*-гидроксибензойной кислоты и семи полиароматических углеводов. Для этих двух классов соединений и, соответственно, двух составов мицеллярного элюента дисперсии фактора удерживания существенно отличаются как по абсолютному значению, так и по характеру скедастических зависимостей: убывающие зависимости в случае эфиров *n*-гидроксибензойной кислоты и возрастающие в случае полиароматических углеводов. Наличие скедастических зависимостей позволяет адекватно учитывать воспроизводимость фактора удерживания при моделировании различных его функций: статистические веса обычно используемых гиперболических и логарифмических функций фактора удерживания можно представить как $w_{1/k} = \frac{k^4}{s_k^2}$ и $w_{\log k} = \frac{k^2}{0.434s_k^2}$, соответственно. В качестве

оценки s_k^2 целесообразно использовать преобладающую составляющую случайной погрешности, например, дисперсию *interday* в случае эфиров ГБК.

Авторы благодарят А.Ю. Куликова, с.н.с. ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр», за рекомендации по составу мицеллярных элюентов и предоставление препаратов ПАУ и эфиров ГБК, а также проф. Л.П. Логинову за полезные обсуждения.

Литература

1. Дрейпер Н., Смит Г. Прикладной регрессионный анализ. Кн. 1. – М.: Финансы и статистика, 1986. – 366 с.
2. Good P.I., Hardin J.W. Common errors in statistics (and how to avoid them). – New Jersey: Wiley-Interscience, 2003. – 222 p.
3. Логинова Л.П., Бойченко А.П. Простая математическая модель удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии// Тези доп. VI Всеукраїнської конференції студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії». – Київ. – 2005. – С. 150.
4. Sadlej-Sosnowska N., Sledzinska I. Validation of chromatographic retention models in reversed-phase high performance liquid chromatography by fitting experimental data to the relevant equations// J. Chromatogr. A – 1992. – Vol. 595. – P. 53-61.
5. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография – Рига: Зинанте, 1988. – 390 с.
6. Jandera P., Churacek J. Gradient elution in liquid chromatography. I. Influence of the composition of the mobile phase on the capacity ratio (retention volume, band width, and resolution) in isocratic elution. Theoretical consideration// J. Chromatogr. – 1974. – Vol. 91. – P. 207-221.
7. Murakami F. Retention behavior of benzene derivatives on bonded reversed-phase columns// J. Chromatogr. – 1979. – Vol. 178. – P. 393-399.
8. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. – М.: Мир, 1989. – 399 с.
9. Soczewinski E. Solvent composition effects in thin-layer chromatography systems of the type silica gel – electron donor solvent// Anal. Chem. – 1969. – Vol. 41, №1. – P. 179-182.
10. Snyder L.R. Principals of adsorption chromatography. – New York: Decker, 1968. – 413 p.
11. Armstrong D.W., Nome F. Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phase in liquid chromatography// Anal. Chem. – 1981. – Vol. 53. – P. 1662-1666.
12. Arunyanart M., Cline Love L.J., Model of micellar effects on liquid chromatography capacity factors and for determination for micelle solute equilibrium constants// Anal. Chem. – 1984. – Vol. 56 –P. 1557-1561.
13. Foley J.P., Critical Compilation of Solute-Micelle binding constants and related parameters from MLC measurements// Anal. Chim. Acta. – 1990. – Vol. 231. –P. 237.
14. Hu W., Haddad P.R. New three-phase model for micellar liquid chromatography// Anal. Comm. – 1998. – Vol. 35 – P. 191-194.

15. Berthod A., Garcia-Alvarez-Coque C. *Micellar Liquid Chromatography*.– Dekker, 2000.– 632 p.
16. Логинова Л.П., Самохина Л.В., Куликов А.Ю. Характеристики мицеллообразования как параметры модели удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии// Вестник Харьков. нац. ун-та. – 2002. - № 573. Химия. Вып. 9(32). – С. 107-114.
17. Куликов А.Ю., Логинова Л.П., Самохина Л.В. Мицеллярная жидкостная хроматография в фармацевтическом анализе (обзор)// Фармаком.– 2004.- № 1.– С. 22-61.
18. Логинова Л.П., Бойченко А.П., Иващенко А.Л., Куликов А.Ю. Адекватность и предсказательная способность моделей в мицеллярной жидкостной хроматографии// Тези доп. II Міжнар. Симпозіуму «Методи хімічного аналізу» – Ужгород. – 2005. – С. 4-5.
19. Kaliszan R. Quantitative structure-retention relationships applied to reversed-phase high performance liquid chromatography// *J. Chromatogr. A* – 1993. – Vol. 656. – P. 417-435.
20. Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Roses M., Bosch E. Prediction of the retention in reversed-phase liquid chromatography using solute – mobile phase – stationary phase polarity parameters// *J. Chromatogr. A* – 2002 – Vol. 955. –P. 19-34.
21. Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Berthod A. Micellar versus hydro-organic mobile phases for retention-hydrophobicity relationship studies with ionizable diuretics and an anionic surfactant// *J. Chromatogr. A* – 2004 – Vol. 1030. – P. 279-288.
22. Pappa-Lousi A., Nikitas P. Statistical tests for the selection optimum parameters set of models describing response surface in reversed-phase liquid chromatography// *Chromatographia* – 2003. – Vol. 57.– P. 169-176.
23. Garcia M.A., Vitha M.F., Marina M.L. Linear solvation energy relationship study of retention in micellar liquid chromatography on a C18 column using sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide mobile phases with alcohol modifiers// *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* – 2000. – Vol. 23, № 6. – P. 873-895.
24. Garcia M.A., Vitha M.F., Sandquist J., Mulville K., Marina M.L. Study of retention in micellar liquid chromatography on C 8 column use of linear solvation energy relationships// *J. Chromatogr. A* – 2001. – Vol. 918. – P. 1-11.
25. Loukas Y.L. Radial basis function networks in liquid chromatography: improved structure-retention relationships compared to principal component regression (PCR) and nonlinear partial least squares regression (PLS)// *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* – 2001. – Vol. 24, № 15. – P. 2239-2256.
26. Yang S., Khaledi M.G. Linear solvation energy relationship in micellar liquid chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography// *J. Chromatogr. A* – 1995 – Vol. 692. – P. 301-310.
27. Escuder-Gilabert L., Sanchis-Mallos J.M., Sagrado S., Medina-Hernandez M.J., Villanueva-Camanas R.M. Chromatographic quantitation of the hydrophobicity of ionic compounds by the use of micellar mobile phases// *J. Chromatogr. A* – 1998 – Vol. 823. – P. 549-559.
28. Medina-Hernandez M.J, Sagrado S. Chromatographic quantification of hydrophobicity using micellar mobile phases// *J. Chromatogr. A* – 1995 – Vol. 718. – P. 273-282.
29. Gil-Augusti M., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Estevo-Romero J. Correlation between hydrophobicity and retention data of several antihistamines in reversed-phase liquid chromatography with aqueous-organic and micellar organic mobile phases// *Anal. Chim. Acta* – 2000. – Vol. 421. – P. 45-55.
30. Szczepaniak W., Szymanski A. Relationship between hydrophobic properties of amphoteric sulfonamides and their retention in micellar reversed phase liquid chromatography// *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* – 2000. – Vol. 23, № 8. – P. 1217-1231.
31. Detroyer A., Vander-Hayden Y., Reynaert K, Massarat D.L. Evaluating “Fast” micellar monolithic liquid chromatography for High-Throughput Quantitative Structure-Retention Relationship Screening// *Anal. Chem.*– 2004. – Vol. 76. – P. 1903-1908.
32. Escuder-Gilabert L., Martin-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camanas R.M., Medina-Hernandez M.J. Biopartitioning micellar liquid chromatography to predict ecotoxicity// *Anal. Chim. Acta* – 2001. – Vol. 448. – P. 173-185.

33. Molero-Monfort M., Martin-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camanas R.M., Medina-Hernandez M.J. Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport// *J. Chromatogr. A* – 2000 – Vol. 870. – P. 57-70.
34. Quonines-Torrelo C., Martin-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camanas R.M., Medina-Hernandez M.J. QRAR models for central nervous system drugs using biopartitioning micellar chromatography// *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* – 2002 – Vol. 2. – P. 145-161.
35. Kim D.H., Lee S.K., Kim W.S., Yang J.S., Lee D.W. Quantitative retention activity relationship of quinolones using micellar liquid chromatography// *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* – 2001. – Vol. 24, № 9. – P. 1309-1322.
36. Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Berthod A. Effects of ionization and the nature of the mobile phase in QSRR and QRAR studies// *J. Chromatogr. A* – 2004. – Vol. 1063. – P. 25-34.
37. Detroyer A., Vander Heyden Y., Carda-Broch S., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Massarat D.L. Quantitative structure retention and retention activity relationships of β -blocking agents by micellar liquid chromatography// *J. Chromatogr. A* – 2001 – Vol. 912. – P. 211-221.
38. Quonines-Torrelo C., Sagrado S., Villanueva-Camanas R.M., Medina-Hernandez M.J. Role of hydrophobicity on the monoamine receptor binding affinities of central nervous system drugs: a quantitative retention-activity relationships analysis using biopartitioning micellar chromatography// *J. Chromatogr. B* – 2004 – Vol. 801. – P. 185-198.
39. Martinez-Pla A., Martin-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camanas R.M., Medina-Hernandez M.J. Evaluation of the pH effect of formulations on the skin permeability of drugs by biopartitioning micellar chromatography// *J. Chromatogr. A* – 2004. – Vol. 1047. – P. 255-262.
40. Jandera P., Fisher J., Effenberg H. Characterization of retention in micellar high-performance liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography using lipophilicity and polarity indices// *J. Chromatogr. A* – 1998 – Vol. 807. – P. 57-70.
41. Yang S., Khaledi M.G. Micellar liquid chromatographic separation of sulfonamides in physiological samples using direct on-column injection// *J. Chromatogr. A* – 1995. – Vol. 692. – P. 311-318.
42. Albala-Hurtado S., Bover-Cid S., Izquierdo-Pulido M., Veciana-Nogues M., Vidal-Carou C. Determination of available lysine in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography// *J. Chromatogr. A* – 1997. – Vol. 778. – P. 235-241.
43. Campanella L., Crescentini G., Avino P. Simultaneous determination of cysteine, cystine and 18 other amino acids in various matrices by high-performance liquid chromatography// *J. Chromatogr. A* – 1999. – Vol. 833. – P. 137-145.
44. Вигдергауз М.С., Петрова Е.И., Шатских С.Я. Оценка погрешностей измерений хроматографического удерживания// *Журн. аналит. химии.* – 1989.- Т. 44, №4. - С. 712-720.
45. Вершинин В.И., Топчий В.А., Медведовская И.И. Критерии совпадения пиков в качественном хроматографическом анализе. Учет воспроизводимости характеристик удерживания// *Журн. аналит. химии.* – 2001.- Т. 56, № 4.- С. 367-373.
46. Вигдергауз М.С., Семенченко Л.В., Езрец В.А. Богословский Ю.Н. Качественный газохроматографический анализ. – М.: Наука, 1978. – 244 с.
47. Berdie L., Santiago-Silva M., Vilanova R., Grimalt J.O. Retention time repeatability as a function of the injection automatism in the analysis of trace organochlorinated compounds with high-resolution gas chromatography // *J. Chromatogr. A* – 1997. – Vol. 778. – P. 23-29.
48. Демиденко Е.З. Линейная и нелинейная регрессии. – М.: Финансы и статистика, 1981. – 302 с.
49. Dean R.B., Dixon W.J. Simplified statistic of small numbers of observations// *Anal. Chem.* – 1951. – Vol. 23., № 4 – P. 636-638.
50. Дворкин В.И. Метрология и обеспечение качества количественного химического анализа. – М.: Химия, 2001. – 263 с.
51. Лемешко Б.Ю. Робастные методы оценивания и отбраковка аномальных измерений// *Завод. лабор.* – 1997.- Т. 63, № 5.- С. 43-49.
52. Konnert A., Berding C. The statistical basis of standardization designs for diagnostic assays// *Accred. Qual. Assur.* – 2004. – Vol. 9. – P. 457-463.

53. Мюллер П., Нойман П., Шторм Р. Таблицы по математической статистике. – М.: Финансы и статистика, 1982. – 278 с.
54. Большев Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. – М.: Наука, 1983. – 416 с.
55. Налимов В.В. Применение математической статистики при анализе веществ. – М.: Гос. изд. физ.-мат. лит., 1960. – 430 с.
56. Дерффель К. Статистика в аналитической химии. – М.: Мир, 1994. – 268 с.
57. Sheskin D.J. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. – Chapman & Hall/CRC, 2000. – 1002 p.
58. Bolton S. Pharmaceutical statistics. Practical and clinical application. – New York: Marcel Dekker, 1997. – 737 p.
59. ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 (группа Т 80) Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений.
60. Adrian van der Veen M.H., Pauwels J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 1. Principles of analysis of variance// Accred. Qual. Assur. – 2000. – Vol. 5. – P. 464-469.
61. Rees D.J. Essential statistics. – London: Chapman & Hall, 1995. – 265 p.

Поступила в редакцию 15 августа 2005 г.

Kharkov University Bulletin. 2005. №669. Chemical Series. Issue 13(36). A.P. Boichenko, A.L. Iwashchenko. Reproducibility of Retention Factor in Micellar Liquid Chromatography.

The article is devoted to problems that are faced in estimating the adequacy of models in micellar liquid chromatography. Functions simulated in high performance liquid chromatography and micellar liquid chromatography are reviewed. The reproducibility and repeatability of the retention factor in micellar liquid chromatography have been studied using the separation data for four ethers of hydroxybenzoic acid and seven polyaromatic hydrocarbons. The one-way analysis of variance was used for separating the total variability into components. For the first time the scedastic curves of retention factor in micellar liquid chromatography were constructed. They appear to decrease for ethers of hydroxybenzoic acid and increase for polyaromatic hydrocarbons. The reproducibility and repeatability of the retention factor of polyaromatic hydrocarbons were higher than for ethers of hydroxybenzoic acid. The scedastic curves permits to introduce statistical weights for modeling in micellar liquid chromatography,

for example $w_{1/k} = \frac{k^4}{s_k^2}$ and $w_{\log k} = \frac{k^2}{0.434s_k^2}$ for hyperbolic and logarithmic functions of retention factor.