

УДК 543.544:544.77

ПРЕЦИЗИОННОСТЬ ПЛОЩАДЕЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПИКОВ В МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2010 А. Л. Иващенко¹, А. П. Бойченко², А. В. Осипов², Л. П. Логинова²

Впервые изучена повторяемость (внутри одной серии измерений) и промежуточная прецизионность (между сериями измерений и между днями) площадей хроматографических пиков в мицеллярной жидкостной хроматографии (МЖХ). Показана зависимость неопределенности площади хроматографического пика от природы и гидрофобности разделяемого соединения, а также значительное увеличение неопределенности хроматографического пика при использовании подвижных фаз с низкой элюирующей силой. Проанализирована возможность увеличения прецизионности при использовании метода внутреннего стандарта. Последний позволяет исключить межсерийный фактор при количественном хроматографическом анализе в течение одного дня.

Ключевые слова: прецизионность, мицеллярная жидкостная хроматография, площадь пика.

Введение

Интерес к неопределенности хроматографических характеристик связан с широким использованием хроматографических данных для контроля качества и физико-химических исследований. В наших предыдущих работах была тщательно исследована неопределенность факторов удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии (МЖХ), которая является одним из вариантов обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Для более детального ознакомления с методом МЖХ мы рекомендуем обратиться к нашим предыдущим работам [1-6] и монографии [7]. Исследования неопределенности факторов удерживания необходимы для моделирования удерживания и построения зависимостей удерживание-свойство. В то же время для количественного хроматографического анализа используются такие характеристики пиков как высота и площадь. Вследствие широкого распространения компьютерной техники практически все хроматографы в настоящее время оснащены интеграторами, позволяющими быстро рассчитывать площадь всех пиков на хроматограмме, поэтому использование высоты пика для количественного хроматографического анализа потеряло свою значимость. Процесс обработки сигналов в хроматографии не будет затрагиваться в этой работе; это отдельная область на стыке химии и прикладной математики, которой посвящены монография [8] и недавно опубликованный обзор [9].

Очевидно, что неопределенность площади пиков должна зависеть от абсолютной величины площади, которая связана с концентрацией аналита. Такие зависимости необходимы для нахождения диапазона линейности, расчета пределов обнаружения и определения, оценки неопределенности количественного хроматографического анализа. В этой работе изучена прецизионность площадей пиков 4-х эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты и 7 полиароматических углеводов при постоянной концентрации аналитов в исследуемом образце, близкой к середине диапазона линейности. Также проанализирован один из способов улучшения прецизионности площадей пиков – использование относительных значений площадей пиков, т.е. метод внутреннего стандарта. Результаты исследований зависимости неопределенности площади пика от концентрации аналита будут рассмотрены нами в дальнейшем.

Экспериментальная часть [2, 6]

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 приго-

¹ Испытательная аналитическая лаборатория, ООО "СТОМА", ул. Ньютона, 3, Харьков 61105, Украина.

² Кафедра химической метрологии, Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61077, Украина.

товлении подвижных фаз и стандартных растворов использовалась мерная посуда I-го класса точности, одинаковая во всех экспериментах.

Реагенты

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

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 4-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 раствором 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 4-гидроксibenзойной кислоты (0.020 г/л).

При разделении эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты в качестве подвижной фазы использовали мицеллярный раствор с молярной концентрацией SDS 0.097 М и объемной долей 1-бутанола 3 %, а при разделении ПАУ — мицеллярный раствор с молярной концентрацией SDS 0.1 М и объемной долей 1-бутанола 15 %. При исследовании промежуточной прецизионности между днями 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 4-гидроксibenзойной 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 парабенов 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.

Для исследования прецизионности площадей пиков парабенов в зависимости от состава подвижной фазы использовали данные, полученные для 9 различных подвижных фаз [6].

Программное обеспечение и базы данных

Для всех расчетов в работе использовались Statistica 8.0, data analysis software system (<http://www.statsoft.com>) и Microsoft Excel (2007, Microsoft, <http://office.microsoft.com>).

Результаты и обсуждение

Неопределенность химического анализа и подходы к ее оценке в хроматографии

Для оценки качества измерений мы будем использовать термин «неопределенность», следуя современным рекомендациям по использованию концепции неопределенности в химическом анализе (в соответствии с рекомендациями Научного совета РАН по аналитической химии, под термином «химический анализ» понимают «экспериментальное получение информации о химическом составе вещества», при этом понятие «химический анализ» не связано с используемыми методами анализа). Несмотря на некоторую непривычность концепции неопределенности для химиков стран СНГ, ее распространение в сферу химического анализа продолжает расширяться. Это связано с необходимостью обеспечения единства измерений на международном уровне. Определение основополагающего термина метрология, приводимого Международным Бюро Весов и Измерений (The International Bureau of Weights and Measures, BIPM [10])

также включает в себя термин «неопределенность»: «Metrology is the science of measurement, embracing both experimental and theoretical determinations at any level of uncertainty in any field of science and technology». Использование концепции неопределенности уже узаконено нормативными документами Украины и России [11].

В соответствии с определением, приведенным в Международном словаре основных и общих терминов в метрологии (International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, VIM [12]), неопределенность это «параметр, связанный с результатом измерения и характеризующий разброс значения, которое с достаточным основанием может быть приписано измеряемой величине» («parameter, associated with the result of measurement, that characterizes the dispersion of the value that could reasonably be attributed to the measurand»). Таким образом, обычные для химиков величины дисперсии, стандартного отклонения или относительного стандартного отклонения могут использоваться в качестве характеристик неопределенности. В наших предыдущих работах показано также, что подход к оценке неопределенности аналитических измерений, устраняя идеализированное понятие погрешности как отклонения от истинного значения, не противоречит сложившейся среди химиков-аналитиков практике обработки, оценки качества и представления результатов химического анализа [13, 14]. В качестве параметра, характеризующего неопределенность площади хроматографического пика, мы использовали величину относительного стандартного отклонения (ОСО).

Существует два принципиально различных подхода к оценке неопределенности конечного результата химического анализа – восходящий (bottom-up) и нисходящий (top-down) [15]. Первый основан на выявлении всех источников неопределенности, составлении диаграммы Ишикавы [16], последующей оценке величин неопределенности, связанных со всеми источниками, и на их основе расчете расширенной неопределенности конечного результата [15]. Этот подход достаточно трудоемок, однако при правильном учете всех источников неопределенности позволяет не только адекватно определить неопределенность конечного результата, но и выявить наиболее значимые источники неопределенности, чтобы в последующем постараться их минимизировать. Нисходящий подход к оцениванию неопределенности конечного результата базируется чаще всего на использовании таких характеристик как промежуточная прецизионность (intermediate precision, прецизионность при изменении условий внутри лабораторий: различные дни, аналитики, оборудование и т.д. [17]) и прецизионность в условиях воспроизводимости (при получении результатов одним методом на идентичных образцах испытания в различных лабораториях, разными операторами с использованием различного оборудования).

К сожалению, национальные и международные руководства по валидации методик хроматографического анализа [17-22], как правило, не предусматривают определения характеристик воспроизводимости. В некоторых случаях это связано с практическими трудностями, в других – со значительным увеличением затрат на разработку методики анализа при выполнении таких исследований. Поэтому в настоящее время при разработке методик хроматографического анализа для оценки неопределенности при помощи «нисходящего» подхода наиболее часто используют данные о промежуточной прецизионности.

Повторяемость и промежуточная прецизионность площадей пиков парабуенов

Термин «повторяемость» обозначает прецизионность в условиях повторяемости, когда независимые результаты испытаний получены одним методом на идентичных образцах испытаний в одной лаборатории одним оператором с использованием одного оборудования и за короткий интервал времени [23]. В наших исследованиях условиям повторяемости соответствовала серия измерений. Для оценки промежуточной прецизионности использовались результаты нескольких серий измерений, полученных в один и тот же день и в разные дни.

Однородность внутрисерийных дисперсий площади пиков парабуенов проверяли по критериям Фишера и Бартлетта; результаты проверки представлены в таблицах 1 и 2 (на диагонали расположены значения степеней свободы для каждой серии, ниже диагоналей представлены экспериментальные значения, выше диагонали – табличные значения критерия Фишера).

На основании приведенных в таблицах 1 и 2 результатов можно сделать вывод об однородности внутрисерийных дисперсий. Однако, как видно из рис. 1, значения внутрисерийного относительного стандартного отклонения достаточно велики и в некоторых случаях достигают 8 %. Кроме того, при сопоставлении серий измерений наблюдается значительный разброс

средних значений площадей пиков, что свидетельствует о необходимости проверки значимости межсерийного фактора и междневного фактора.

Таблица 1. Значения критерия Фишера для внутрисерийных дисперсий площадей хроматографических пиков (жирным выделено число степеней свободы в каждой серии)

		Ме-парабен							Ет-парабен				
		Табличные значения критерия Фишера ($p=0.05, f_1, f_2$)							Табличные значения критерия Фишера ($p=0.05, f_1, f_2$)				
Экспериментальные значения критерия Фишера	2	19.2	19.3	19.4	19.4	Экспериментальные значения критерия Фишера	2	19.2	19.3	19.4	19.4		
	1.3	4	6.3	6.1	6.0		4.5	4	6.3	4.1	6.0		
	2.4	3.2	5	4.0	4.7		5.4	1.2	5	4.0	4.7		
	1.5	2.0	1.6	7	3.6		3.8	1.2	1.4	7	3.6		
	4.1	5.6	1.7	2.8	10		5.8	1.3	1.1	1.5	10		
		Рг-парабен							Ви-парабен				
		Табличные значения критерия Фишера ($p=0.05, f_1, f_2$)							Табличные значения критерия Фишера ($p=0.05, f_1, f_2$)				
Экспериментальные значения критерия Фишера	2	6.9	5.8	19.4	19.4	Экспериментальные значения критерия Фишера	2	19.2	5.8	4.7	19.4		
	1.1	4	6.3	6.1	6.0		1.4	4	6.3	4.1	6.0		
	1.1	1.0	5	4.9	4.7		4.4	6.1	5	4.9	4.7		
	1.3	1.4	1.4	7	3.6		1.1	1.5	4.1	7	3.6		
	1.9	2.1	2.1	1.5	10		3.4	2.5	1.5	3.7	10		

Таблица 2. Значения критерия Бартлетта для дисперсий площадей пиков парабеинов, полученных в течение одного дня и в течение трех дней

	Ме-парабен	Ет-парабен	Рг-парабен	Ви-парабен
χ^2 (внутрисерийная дисперсия в течение одного дня) ($\chi^2_{теор.} = 5.99$; $P = 0.95$, $n = 3$)	1.38	1.43	$8.1 \cdot 10^{-3}$	1.38
χ^2 (внутрисерийная дисперсия в течение трех дней), ($\chi^2_{теор.} = 9.48$; $P = 0.95$, $n = 5$)	4.53	1.43	1.20	9.30

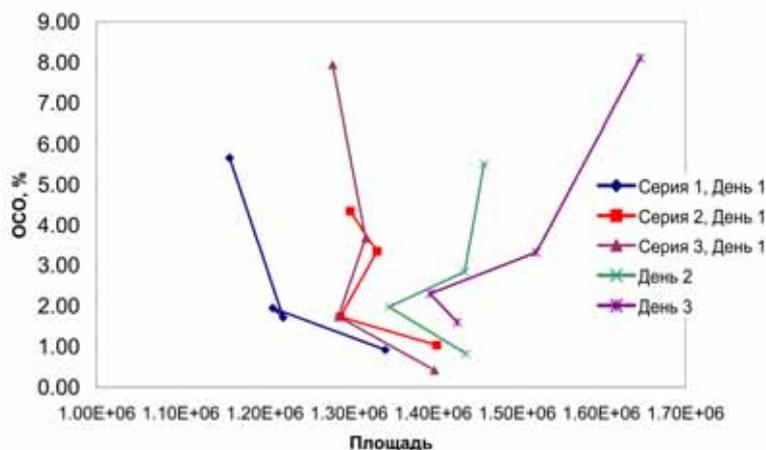


Рис. 1. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика внутри серий от среднего значения площади пика внутри серий.

Действительно, значения критерия Фишера (таблица 3) указывают на значимость межсерийного фактора для площадей пиков этилового, пропилового и бутилового эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты при уровне значимости 0.05, т.е. средние значения площадей пиков статистически различаются для данных, полученных со вновь приготовленными фазами в течение одного дня (серия 1-3).

Таблица 3. Результаты дисперсионного анализа для площадей пиков парабенов

	Ме-парабен	Et-парабен	Pr-парабен	Vi-парабен
Дисперсия <i>внутри серий</i>	$6.65 \cdot 10^9$	$1.87 \cdot 10^9$	$5.09 \cdot 10^8$	$1.20 \cdot 10^8$
Дисперсия <i>между сериями</i>	$2.11 \cdot 10^{10}$	$1.30 \cdot 10^{10}$	$7.37 \cdot 10^9$	$4.20 \cdot 10^9$
F-критерий ($F_{\text{табл.}, 0.05, 2, 11} = 3.98$)	3.2	7.0	14.5	34.9
s^2_T	$3.22 \cdot 10^9$	$2.48 \cdot 10^9$	$1.52 \cdot 10^9$	$9.06 \cdot 10^8$
ОСО, %	4.49	3.82	3.07	2.17

Значения междневной дисперсии оказались сопоставимыми с межсерийной (данные не приведены), однако провести строгий статистический анализ этих данных не представилось возможным. На рис. 2 и 3 представлены зависимости внутрисерийного стандартного отклонения площади пика и относительного стандартного отклонения от гидрофобности парабенов.

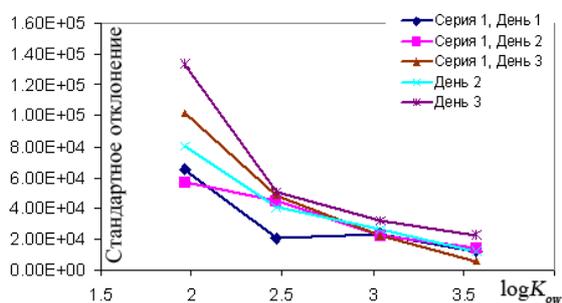


Рис. 2. Зависимость стандартного отклонения площади пика внутри серий от гидрофобности парабена.

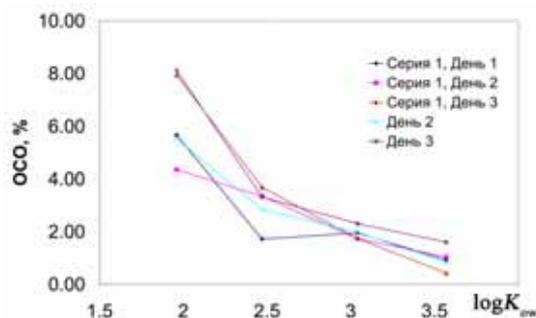


Рис. 3. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика внутри серий от гидрофобности парабена.

Очевидно, что значения внутрисерийных стандартных отклонений площадей пиков имеют больший разброс для метилового и этилового парабенов, чем для пропилового и бутилового. Кроме того, значения относительного стандартного отклонения значительно снижаются с увеличением гидрофобности и, следовательно, удерживания парабенов.

Повторяемость и промежуточная прецизионность площадей пиков полиароматических углеводов

В случае ПАУ дисперсии внутри серий в соответствии с критерием Бартлетта также оказались однородными (табл. 4). Исследование влияния замены подвижной фазы в течение одного дня на повторяемость площадей пиков показало, что для ПАУ, в отличие от парабенов, этот фактор является незначимым, за исключением наименее удерживаемого бензола. Вместе с меньшими значениями относительного стандартного отклонения площадей пиков (рис. 4) это свидетельствует о более высокой прецизионности площадей пиков, полученных в один день для ПАУ, по сравнению с парабенами.

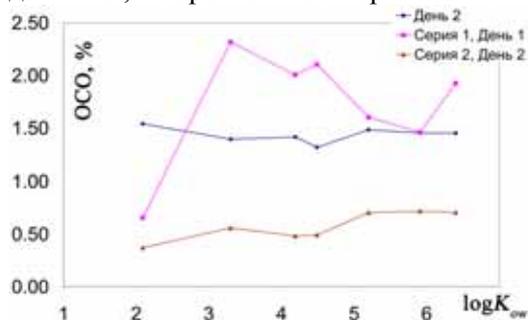


Рис. 4. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика внутри серий от гидрофобности ПАУ.

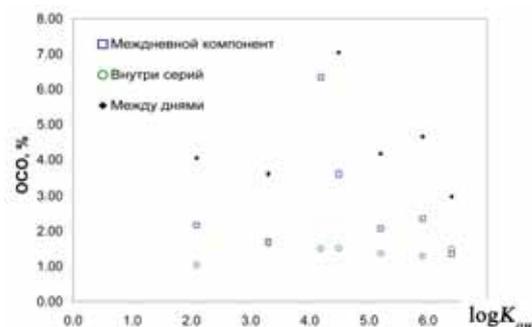


Рис. 5. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика между днями, внутри серий и междневного компонента от гидрофобности ПАУ.

В ходе оценки значимости междневного фактора оказалось, что результаты для разных ПАУ отличаются. Так для бензола, аценафтена, фенантрена и хризена междневной фактор оказался значимым даже для 1% уровня значимости. В то же время для остальных исследованных ПАУ междневной фактор оказался незначимым (табл. 4).

В общем, для ПАУ можно сделать следующие выводы: значения относительного стандартного отклонения площадей пиков ПАУ не зависят от их гидрофобности и фактора удерживания, а абсолютные значения относительного стандартного отклонения площади пика для ПАУ ниже, чем для парабиенов.

Для изучения причин более высокой прецизионности площадей пиков ПАУ по сравнению с парабиенами необходимы дополнительные исследования прецизионности площади пиков для других групп соединений с использованием различных подвижных фаз, а также оценки инструментальных погрешностей интегрирования хроматографических пиков. Однако очевидно, что прецизионность площадей пиков должна вносить значительный вклад в неопределенность результатов количественного анализа в МЖХ.

Таблица 4. Дисперсионный анализ результатов измерения площадей пиков ПАУ

	Бензол	Нафталин	Аценафтен	Фенантрен	Флуорантен	Хризен	Бенз(а)пирен
Дисперсия <i>внутри серий 2-3</i>	$2.94 \cdot 10^8$	$3.00 \cdot 10^9$	$8.19 \cdot 10^8$	$9.66 \cdot 10^8$	$2.94 \cdot 10^9$	$3.96 \cdot 10^9$	$4.09 \cdot 10^8$
Дисперсия <i>между сериями 2-3</i>	$3.07 \cdot 10^{10}$	$5.68 \cdot 10^9$	$9.16 \cdot 10^8$	$3.99 \cdot 10^9$	$1.77 \cdot 10^{10}$	$2.18 \cdot 10^{10}$	$2.91 \cdot 10^9$
<i>F</i> -критерий ($F_{\text{табл.}, 0.05, 1,7}=5.59$; $F_{\text{табл.}, 0.01, 1,7}=12.2$)	104.41	1.89	1.12	4.13	6.03	5.51	7.11
χ^2 (внутрисерийная дисперсия для двух дней), ($\chi^2_{\text{теор}} = 5.99$; $P = 0.95$, $n = 3$)	6.0	4.4	4.4	4.7	1.7	1.4	2.4
Дисперсия <i>внутри серий 1-3</i>	$1.04 \cdot 10^9$	$2.56 \cdot 10^9$	$7.40 \cdot 10^8$	$8.32 \cdot 10^8$	$3.23 \cdot 10^9$	$4.55 \cdot 10^9$	$3.93 \cdot 10^8$
Дисперсия <i>между днями</i>	$1.58 \cdot 10^{10}$	$1.22 \cdot 10^{10}$	$4.94 \cdot 10^{10}$	$1.81 \cdot 10^{10}$	$3.03 \cdot 10^{10}$	$5.93 \cdot 10^{10}$	$1.56 \cdot 10^{10}$
<i>F</i> -критерий ($F_{\text{табл.}, 0.05, 1,11}=4.84$; $F_{\text{табл.}, 0.01, 1,11}=9.65$)	15.13	4.77	66.83	21.70	9.40	13.03	3.98

Влияние состава подвижной фазы на прецизионность площадей пиков парабиенов

Для получения зависимости неопределенности площади пика парабиена от фактора удерживания мы изучили повторяемость площадей пиков, варьируя значения фактора удерживания не за счет изменения гидрофобности в ряду гомологов или конгенериков, а изменяя состав и, следовательно, элюирующую силу подвижной фазы.

В жидкостной хроматографии с увеличением времени удерживания наблюдается уширение хроматографических пиков. Такая закономерность объясняется фундаментальной связью между эффективностью колонки, шириной пика и временем удерживания $N = 5.54(t/w_{0.5})^2$, где t – время удерживания, $w_{0.5}$ – ширина пика на половине высоты (для «гауссовых» пиков). При изучении зависимости дисперсии площади хроматографических пиков от значения фактора удерживания оказалось, что она несколько возрастает при увеличении фактора удерживания (рис. 6).

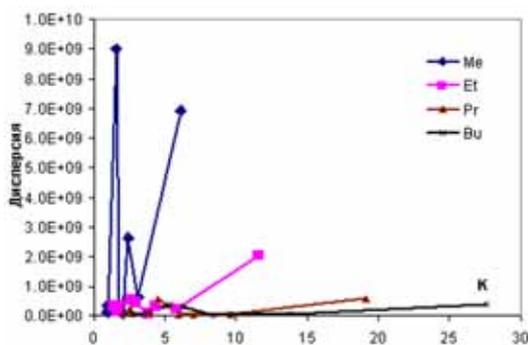


Рис. 6. Зависимость дисперсии площади пика внутри серий от фактора удерживания парабенов.

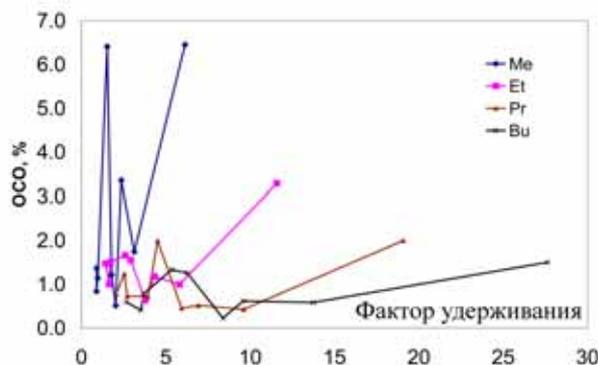


Рис. 7. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика внутри серий от фактора удерживания парабенов.

Увеличение относительного стандартного отклонения наблюдается для наиболее слабой подвижной фазы (максимальные значения фактора удерживания для каждого парабена, рис. 7). Однако необходимо отметить, что для большинства подвижных фаз относительное стандартное отклонение площади пиков не имеет строго выраженной зависимости от абсолютного значения фактора удерживания и составляет 1% - 2%. Отсюда следует, что неопределенность площади пика определяется в большей мере особенностями разделения конкретных аналитов, например, слишком малыми или слишком высокими временами удерживания.

Таким образом, очевидно, что при разработке методик анализа и их последующей валидации важным является не только оптимизация селективности разделения аналитов, но и разработка подходов, позволяющих в каждом конкретном случае добиться приемлемой неопределенности площади хроматографических пиков.

Относительные значения площадей пиков как способ увеличения прецизионности количественного хроматографического анализа

Одним из методов обеспечения правильности хроматографического анализа является использование внутреннего стандарта. Такой подход широко распространен в газовой хроматографии. В то же время в жидкостной хроматографии в основном пользуются методом внешнего стандарта, хотя использование внутреннего стандарта может улучшить прецизионность измерений за счет исключения вкладов таких компонентов как дозирование пробы, дрейф базовой линии и дрейф показаний детектора. Для изучения возможности улучшения прецизионности измерений площадей хроматографических пиков были использованы экспериментальные данные, которые обрабатывались выше. Нормализацию площадей пиков парабенов проводили по пику пропилового эфира 4-гидроксibenзойной кислоты, а нормализацию площадей пиков ПАУ проводили по пику фенантрена.

Оказалось, что использование относительных значений площадей пиков позволяет значительно увеличить прецизионность площадей пиков парабенов в течение одного дня и нивелировать межсерийный фактор при разделении парабенов. Однако междневной фактор остается значимым (табл. 5).

Таблица 5. Дисперсионный анализ прецизионности площадей пиков парабенов, нормал, зованных на площадь Pr-парабена

	Me-парабен	Et-парабен	Bu-парабен
Дисперсия внутри серий (день 1)	$3.31 \cdot 10^{-3}$	$4.66 \cdot 10^{-4}$	$1.97 \cdot 10^{-4}$
Дисперсия между сериями (день 1)	$2.45 \cdot 10^{-3}$	$5.05 \cdot 10^{-4}$	$5.64 \cdot 10^{-4}$
Дисперсия внутри серий (день 1-3)	$3.70 \cdot 10^{-3}$	$2.92 \cdot 10^{-4}$	$1.96 \cdot 10^{-4}$
Дисперсия между днями	$1.71 \cdot 10^{-1}$	$2.25 \cdot 10^{-2}$	$2.32 \cdot 10^{-2}$
F-критерий ($F_{\text{табл. } 0.05, 2, 30} = 3.31$)	46	77	117

Кроме того, использование относительных значений площадей пиков позволило несколько снизить значения относительного стандартного отклонения площадей пиков парабенатов (ср. рис. 8 и 3).

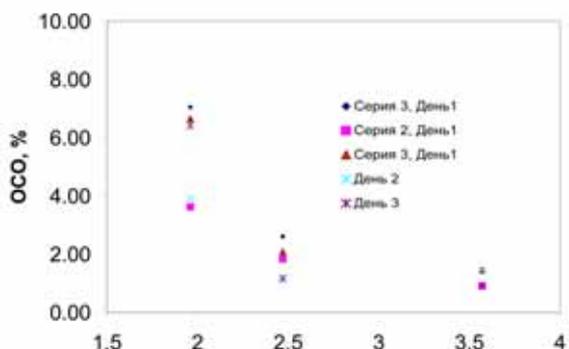


Рис. 8. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика внутри серий от гидрофобности парабенатов.

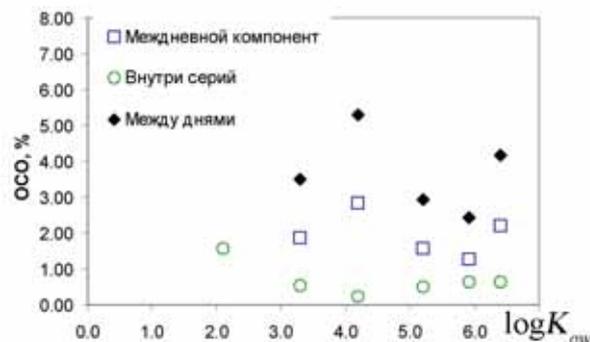


Рис. 9. Зависимость относительного стандартного отклонения относительной площади пика ПАУ между днями, внутри серий и междневного компонента от гидрофобности ПАУ.

Увеличение прецизионности также наблюдалось и в случае ПАУ (ср. рис. 9 и 5). При этом междневной фактор остался значимым. Это свидетельствует о необходимости проведения градуировки для количественного анализа в МЖХ непосредственно перед проведением самого анализа. При этом неопределенность площади пика при оптимальных условиях разделения может составлять менее 1 %.

ВЫВОДЫ

Исследования повторяемости и промежуточной прецизионности площадей пиков в МЖХ позволили выявить межсерийный (за счет приготовления новой порции мицеллярного элюента) и междневной факторы, влияющие на неопределенность площади хроматографического пика. Нормирование площадей пиков парабенатов по внутреннему стандарту позволило увеличить прецизионность относительных площадей пиков в течение одного дня и нивелировать межсерийный фактор при разделении парабенатов, однако междневной фактор остается значимым. Характеристики прецизионности площадей пиков парабенатов изменяются как с увеличением фактора удерживания за счет роста гидрофобности гомологов, так и с увеличением фактора удерживания одного и того же вещества при использовании мицеллярных подвижных фаз с низкой элюирующей силой.

Литература

1. Иващенко А.Л., Бойченко А.П., Логинова Л.П. *Первое сообщение о возможности одновременного изократического разделения водо- и жирорастворимых витаминов методом ВЭЖХ. Вісник Харк. нац. ун-ту, Серія Хімія.* 15(38) (2007) 82-89.
2. Бойченко А.П., Иващенко А.Л. *Воспроизводимость фактора удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии. Вісник Харк. нац. ун-ту, Серія Хімія.* 13(36) (2005) 107-118.
3. Loginova L.P., Samokhina L.V., Boichenko A.P., Kulikov A.U. *Micellar liquid chromatography retention model based on mass-action concept of micelle formation. J. Chromatogr. A* 1104(1-2) (2006) 190-197.
4. Boichenko A.P., Loginova L.P., Kulikov A.U. *Micellar liquid chromatography (Review). Part 1. Fundamentals, retention models and optimization of separation Методы и объекты химического анализа* 2(2) (2007) 92-116.
5. Boichenko A.P., Loginova L.P., Iwashchenko A.L., Kulikov A.U. *New approach to modeling in micellar liquid chromatography. Res. J. Chem. Environ.* 10(4) (2006) 53-62.

6. Boichenko A.P., Iwashchenko A.L., Loginova L.P., Kulikov A.U. *Heteroscedasticity of retention factor and adequate modeling in micellar liquid chromatography*. **Anal. Chim. Acta** 576(2) (2006) 229-238.
7. Berthod A., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *Micellar Liquid Chromatography*. New York, Basel: Marcel Dekker, (2000)
8. Fellingner A. *Data Analysis and Signal Processing in Chromatography*. Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Singapore-Tokyo: Elsevier, (1998) 430.
9. Amigo J.M., Skov T., Bro R. *ChroMATHography: Solving Chromatographic Issues with Mathematical Models and Intuitive Graphics*. **Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)** 110(8) (2010) 4582-4605.
10. The International Bureau of Weights and Measures <http://www.bipm.org/>, (2010).
11. ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006, *Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий*. (2006) 32.
12. JCGM 200:2008, *International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)*. JCGM 200 (2008) 104.
13. Логінова Л.П., Бойченко А.П. *Оценка неопределенности результатов химического анализа по руководству EURACHEM/CITAC и традиционная концепция погрешностей*. Сесія Наукової ради НАНУ з проблеми «Аналітична хімія», Одеса (2006) 50-51.
14. Loginova L.P., Boichenko A.P., Maslij O.G. *Uncertainty estimation vs. traditional concept of errors: application in applied analytical chemistry and chemical education*. 4th Black Sea Basin conference on analytical chemistry, Sunny Beach, Bulgaria (2007) OM3.
15. Konieczka P., Namieśnik J. *Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques*. **J. Chromatogr. A** 1217(6) (2010) 882-891.
16. Ishikawa K. *Introduction to Quality Control*. Productivity Press, (1990)
17. Q2(R1), *Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH harmonised tripartite guideline*. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2005) 17.
18. *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. **Pure Appl. Chem.** 74(5) (2002) 835 - 855.
19. Technical Note 17, *Guidelines for the validation and verification of chemical test methods*. (2009) 11.
20. Ellison S.L.R., Barwick V.J. *Using validation data for ISO measurement uncertainty estimation - Part 1. Principles of an approach using cause and effect analysis*. **Analyst** 123(6) (1998) 1387-1392.
21. *Державна Фармакопея України/Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр"*. Харків: PIPEГ, (2001) 556.
22. United States Pharmacopoeial Convention Inc., *The United States Pharmacopoeia*. (2004).
23. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов. Часть 1. Основные положения и определения. (2002) 32.

Поступила в редакцию 10 августа 2010 г.

А. Л. Іващенко, О. П. Бойченко, А. В. Осипов, Л. П. Логінова. Прецизійність площ хроматографічних піків в міцелярній рідинній хроматографії.

Вперше було досліджено повторюваність (протягом однієї серії вимірювань) та проміжну прецизійність (між серіями вимірювань та між днями) площ хроматографічних піків в міцелярній рідинній хроматографії (МРХ). Показано залежність невизначеності площі хроматографічного піку від типу речовини, що розділяють, та її гідрофобності, а також значне підвищення невизначеності площі хроматографічного піку при використанні рухомих фаз з низькою елююючою силою. Проаналізовано можливість збільшення прецизійності при використанні методу внутрішнього стандарту. Метод внутрішнього стандарту дозволяє виключити міжсерійний фактор при кількісному хроматографічному аналізі, що виконується протягом одного дня.

Ключові слова: прецизійність, міцелярна рідинна хроматографія, площа піку.

A. L. Iwashchenko, A. P. Boichenko, A. V. Osipov, L. P. Loginova. Precision of chromatographic peaks area in micellar liquid chromatography.

For the first time the repeatability (inside series of measurements) and intermediate precision (between series and days) of the chromatographic peaks area have been studied in micellar liquid chromatography (MLC). The dependence of the uncertainty of area of chromatographic peaks on the nature of separated compounds and their hydrophobicity, as well as considerable increase of the uncertainty of area of chromatographic peaks was observed when the mobile phases with low elution strength are used. The possibility to increase the precision using internal standard method was tested. This method allows excluding the intra-series component of uncertainty for quantitative chromatographic analysis during one day.

Key words: precision, micellar liquid chromatography, peak area.

Kharkov University Bulletin. 2010. № 932. Chemical Series. Issue 19(42).