

ОПТИМИЗАЦИЯ РАЗДЕЛЕНИЯ В МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.П. Бойченко¹, Л.П. Логинова¹, А.Ю. Куликов²

¹ Кафедра химической метрологии, Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61077, Украина.

² ГП "Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств", ул. Астрономическая, 33, Харьков 61085, Украина

Выбор оптимальных условий разделения в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при разработке новых методик анализа является достаточно сложной задачей, т.к. необходимо учесть большое число факторов, которые часто зависят друг от друга. Кроме того, в ВЭЖХ отсутствуют устойчивые модели процессов разделения, которые могли бы использоваться при разработке любой методики разделения солютов. Традиционно в ВЭЖХ, также как и в других методах химического анализа, используют метод проб и ошибок, что повышает затраты на разработку новых методик. Применение математических методов и систематического подхода к разработке методик анализа позволяет значительно сократить время разработки, а также подтвердить оптимальность выбранных условий разделения. В последнее время постоянно возрастает интерес к предварительному планированию эксперимента и оценке полученных результатов разделения не только на основании мнения хроматографиста, но и количественно, при помощи специальных критериев.

Однако, несмотря на значительный прогресс в области применения математических методов в химии, вопрос о выборе оптимальных условий разделения многокомпонентных смесей солютов остается не решенным окончательно. Решение конкретной задачи разделения включает как априорный выбор варианта ВЭЖХ, основанный на данных о физико-химических свойствах разделяемых солютов и свойствах стационарной и подвижной фазы, так и последующую оптимизацию условий разделений: состава подвижной фазы, рН, скорости подвижной фазы, температуры и т.д.

В этой работе представлен литературный обзор существующих подходов к моделированию удерживания и оптимизации разделения в ВЭЖХ и одном из вариантов ВЭЖХ – мицеллярной жидкостной хроматографии (МЖХ), а также подходы, разработанные авторами за последние несколько лет работы в области МЖХ.

1. Моделирование удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии

Жидкостная хроматография по частоте использования в аналитической практике, прогрессу научных исследований, количеству публикаций и разнообразию применений занимает лидирующие позиции в современном химическом анализе. Специальные периодические издания, посвященные проблемам жидкостной хроматографии, такие как *Separation and Purification Reviews*, *Journal of Chromatography A*, *Journal of Chromatography B*, *Chromatographia*, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, *Journal of Separation Science*, *Journal of Chromatographic Science* имеют самые высокие показатели цитируемости среди журналов по аналитической химии.

Разнообразие методов жидкостной хроматографии обусловлено применением разных стационарных и подвижных фаз, детекторов, колонок, разных принципов хроматографирования [1]. В последние десятилетия в жидкостной хроматографии появились новые области, связанные с использованием особых подвижных фаз – нанодисперсных систем, таких как мицеллярные растворы ПАВ, прямые и обращенные микроэмульсии, растворы циклодекстринов и другие организованные системы [2-6].

Метод МЖХ привлекает исследователей новыми возможностями разделения, которые оказались полезными при анализе фармацевтических препаратов [7-13], неорганических катионов и анионов [14, 15], белков и т.п. К преимуществам МЖХ относят: (i) возможность одновременного разделения ионных и неионных аналитов, связанную с дифильным характером мицелл ПАВ; (ii) прямое введение биологических жидкостей в колонку при использовании в качестве подвижных фаз мицеллярных растворов неионных и анионных ПАВ, солюбилизирующих белковую матрицу; (iii) возможность модификации подвижной фазы как добавками солей, так нерастворимыми в воде реагентами; (iv) уникальную селективность, которая обусловлена микрогетерогенностью мицеллярных элюентов и динамической модификацией стационарной фазы; (v) робастность результатов, которая обеспечивается стабилизацией концентрации мономеров ПАВ в присутствии мицелл; (vi) малое время кондиционирования колонки при градиентном элюировании; (vii) снижение предела определения при использовании флуоресцентного детектора вследствие усиления флуоресценции аналитов, солюбилизированных мицеллами ПАВ; (viii) низкую стоимость мицеллярных элюентов; (ix) безопасность мицеллярных элюентов по сравнению с летучими, токсичными и воспламеняющимися растворителями, которые применяются ОФ-ВЭЖХ.

Метод МЖХ продолжает динамично развиваться и находить все новые применения. Совершенствование метода связано как с химической проблематикой – поиском и изучением новых хроматографических фаз, так и с разработкой и внедрением в практику МЖХ современных хемометрических приемов оптимизации хроматографического разделения.

Зависимости, которые описывают влияние состава подвижной фазы на фактор удерживания, исследуют как в ОФ-ВЭЖХ, так и в МЖХ. Во-первых, такие зависимости широко применяются для оптимизации разделения; во-вторых, данные об удерживании используют для построения зависимостей удерживание-гидрофобность, удерживание-биологическая активность; в-третьих, исследование удерживания веществ разного строения в различных хроматографических условиях может содействовать пониманию фундаментальных основ разделения в хроматографии.

Присутствие в мицеллярном элюенте микроагрегатов ПАВ полностью изменяет условия хроматографического разделения в МЖХ по сравнению с ОФ-ВЭЖХ. Стационарная фаза с привитыми алкильными радикалами динамически модифицируется мономерами ПАВ и молекулами органического модификатора, и ее поверхность приобретает новые свойства. В подвижной фазе присутствуют ультрамикроагрегаты ПАВ, которые находятся в динамическом равновесии с мономерами ПАВ. Вследствие специфического состояния подвижной и стационарной фазы физико-химические и эмпирические модели удерживания, которые достаточно хорошо разработаны для ОФ-ВЭЖХ, не подходят для МЖХ.

Модели хроматографического удерживания по происхождению и характеристикам можно разделить на три основные группы: (i) физико-химические; (ii) механистические и эвристические; (iii) эмпирические. Физико-химические модели удерживания получают на основе фундаментальных уравнений для хроматографического удерживания и процессов в хроматографической колонке. Параметры таких моделей имеют понятный физико-химический смысл и в некоторых случаях могут быть проверены независимыми экспериментами. Параметры механистических моделей удерживания также могут иметь физико-химический смысл, однако получение уравнений для таких моделей основано на эмпирическом описании процессов хроматографического разделения. Эмпирические модели удерживания представляют собой функции фактора удерживания от состава подвижной фазы, подобранные для наилучшего описания экспериментальных данных об удерживании аналитов. Чаще всего для оптимизации разделения применяют эмпирические модели. В то же время именно они иногда составляют основу для поиска механистических или даже физико-химических моделей с аналогичными функциональными зависимостями.

Сегодня существует два основных подхода к построению физико-химических моделей удерживания в МЖХ в соответствии с двумя концепциями мицеллообразования: первый подход основан на псевдофазной концепции мицеллообразования и представлениях о трехфазном распределении аналита; второй – на квазихимической концепции мицеллообразования и представлениях об изменении микроокружения аналита при переходе с подвижной фазы на стационарную.

1.1 Модели удерживания, основанные на представлениях о трехфазном распределении аналита

На основе псевдофазной концепции мицеллообразования предложено несколько физико-химических моделей удерживания, уравнения которых можно получить друг из друга простыми преобразованиями: уравнение Армстронга и Нома [16], Аруньяртам и Клин Лава [17] и Фолея [18].

На рис. 1 схематически показано распределение солюта между мицеллами ПАВ, стационарной фазой и объемом подвижной фазы, при этом предполагается, что перенос солюта напрямую от мицелл подвижной фазы на динамически модифицированную стационарную фазу играет незначительную роль в хроматографическом процессе.

Модель Армстронга и Нома

Трехфазная модель Армстронга и Нома [16] объясняет хроматографическое поведение солюта в терминах параметров колонки, характеристик мицелл ПАВ и трех коэффициентов распределения. Основное уравнение (1), полученное на основании

теории теоретических тарелок, включает молярный объем мицеллизованного ПАВ (\bar{v}), концентрацию ПАВ в мицеллах (c_s), которая равна общей концентрации ПАВ в подвижной фазе за вычетом критической концентрации мицеллообразования, объем стационарной фазы (V_s), мертвый объем (V_m), объем элюирования (V_e), коэффициент распределения солюта между стационарной фазой и водой (P_{SW}), коэффициент распределения солюта между мицеллой и водой (P_{MW}):

$$\frac{V_s}{V_e - V_m} = \frac{\bar{v}(P_{MW} - 1)}{P_{SW}} c_s + \frac{1}{P_{SW}}. \quad (1)$$

Третий коэффициент распределения солюта (между стационарной фазой и мицеллой, P_{SM}) можно легко рассчитать, если известны два других коэффициента распределения:

$$P_{SM} = \frac{P_{SW}}{P_{MW}}. \quad (2)$$

Необходимо отметить, что вывод модели удерживания (1) близок к выводу модели, предложенной Херисом и др. для гель-фильтрационной хроматографии с мицеллярными элюентами [19].

Модель Аруньяртам и Клин Лава

Уравнение (3), предложенное Аруньяртом и Клин

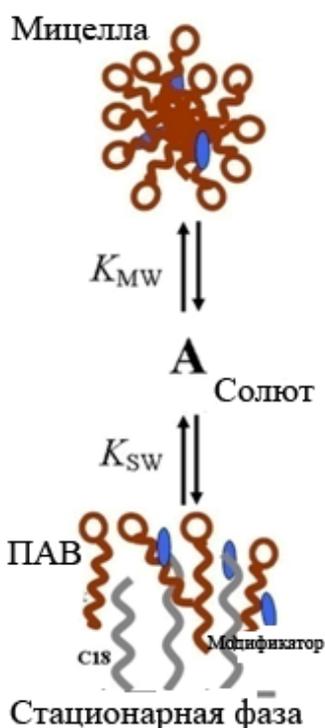


Рисунок 1. Схема распределения солюта между стационарной фазой, мицеллами ПАВ в подвижной фазе и объемом водной фазы.

Лавом [17], приводит к аналогичной гиперболической зависимости фактора удерживания от концентрации ПАВ в мицеллах. Однако его вывод основан на предположении, что удерживание в МЖХ может быть описано двумя основными равновесиями: взаимодействие солюта, находящегося в объеме подвижной фазы (A_m) с доступными местами на стационарной фазе (L_s) (уравнение (4)); распределение солюта в подвижной фазе между объемом водной фазы и мицеллами ПАВ (M_m) (уравнение (5)). Третье обратимое равновесие соответствует прямому переносу солюта, солюбилизированного мицеллами ПАВ (AM_m), из подвижной на стационарную фазу и описывается уравнением (6), которое является линейной комбинацией двух предыдущих.

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{\phi[L_s]K_1} + \frac{K_2}{\phi[L_s]K_1} c_s, \quad (3)$$



В уравнении (3) константы K_1 и K_2 являются константами ЗДМ равновесий (4) и (5), k — фактор удерживания солюта; ϕ — фазовое отношение.

Модель Фолея

Фолей [18] использовал известный подход к описанию хроматографического удерживания в присутствии вторичных химических равновесий; к ним в случае МЖХ относятся взаимодействия солют-мицелла. В полученном уравнении (7) k — фактор удерживания солюта; k_s — фактор удерживания солюта при отсутствии взаимодействия солют-мицелла; K_{sm} — константа равновесия солют-мицелла:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_s} + \frac{K_{sm}}{k_s} c_s. \quad (7)$$

Используя связь между коэффициентом распределения и константой связывания солюта мицеллами и между фактором удерживания и объемами фаз, уравнение (1) можно представить в виде:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{K_{sw}} + \frac{K_{mw}}{K_{sw}} c_s,$$

где K_{sw} — константа распределения солюта между стационарной и водной фазами; K_{mw} — константа связывания солюта мицеллами ПАВ; c_s — концентрация ПАВ.

Отсюда видно, что уравнения (1), (3) и (7) соответствуют друг другу, описывая гиперболическую зависимость фактора удерживания от концентрации ПАВ в мицеллярном элюенте.

Модель удерживания солютов, способных к ионизации

Как указывалось выше, одним из важных преимуществ МЖХ является возможность разделять заряженные и незаряженные соли одновременно. Роджерс и др. [20, 21] предложили модель удерживания, позволяющую описывать удерживание ионизированных соединений как функцию концентрации мицелл ПАВ и pH подвижных фаз. Вывод описывающего уравнения основан на учете трехфазного распределения каждой протолитической формы соли и равновесия между ними. Модель протестировали на примере разделения цвиттер-ионных солей (фенилаланин, триптофан, метионин, фенилпропионовая кислота) с использованием мицеллярных подвижных фаз на основе додецилсульфата натрия (ДСН). Обработка экспериментальных данных с использованием предложенного уравнения позволила рассчитать кажущиеся константы диссоциации (K_a^a) при каждой концентрации ДСН. Сдвиги значений pK_a^a находятся в хорошем соответствии с ожидаемыми в среде анионного ПАВ. Показано, что величина сдвига pK_a^a в мицеллярной среде сильно зависит от структуры веществ, что увеличивает селективность разделения с мицеллярными подвижными фазами соединений, близких между собой по протолитическим свойствам в водных растворах [21].

Упомянутые физико-химические модели удерживания пригодны только для моделирования поведения соли при изменении концентрации ПАВ в мицеллярном элюенте в отсутствие или при постоянном содержании органического модификатора. Для моделирования удерживания при изменении содержания в мицеллярном элюенте как ПАВ, так и органического модификатора, предложен ряд механистических и эмпирических моделей удерживания [22-28].

Эмпирические модели [22-28] можно разделить на две основные группы. В первой группе в качестве зависимой переменной используют обратную величину фактора удерживания по аналогии с физико-химическими моделями, которые базируются на модели трехфазного распределения аналита; во второй группе зависимой переменной является логарифм фактора удерживания по аналогии с моделями удерживания, используемыми в ОФ-ВЭЖХ. Правые части уравнений эмпирических моделей представлены полиномами, включающими члены, линейные относительно концентрации ПАВ и объемной доли модификатора, их квадратов и квадратных корней. Среди эмпирических моделей наиболее часто используются гиперболические модели.

Механистические модели удерживания были предложены как расширение модели Арунъярта та Клин-Лава для учета влияния органического модификатора на удерживание [29-31]. Для этого в уравнение трехфазной модели были введены константы двух дополнительных равновесий, которые характеризуют взаимодействия между органическим модификатором и стационарной фазой и между органическим модификатором и мицеллами ПАВ.

Другой группой авторов были получены механистические уравнения на основе использования так называемых «условных» констант трехфазного распределения в

МЖХ системе. Условные константы описывают смещение равновесия распределения солюта между мицеллярной фазой и водной фазой (K_{MW}) и между стационарной фазой и водной фазой (K_{SW}) в присутствии органического модификатора, по сравнению с мицеллярным элюентом без модификатора:

$$K'_{MW} = \frac{[AM]'}{[A]'} = \frac{[AM] + \Delta[AM]}{[A] + \Delta[A]}, \quad (8)$$

$$K'_{SW} = \frac{[AS]'}{[A]'} = \frac{[AS] + \Delta[AS]}{[A] + \Delta[A]}, \quad (9)$$

где $[A]'$, $[AM]'$, $[AS]'$ – концентрации «свободного» аналита в объеме водной фазы, аналита в мицеллярной псевдофазе и аналита на стационарной фазе соответственно в присутствии органического модификатора; $[A]$, $[AM]$, $[AS]$ – то же для мицеллярного элюента, не содержащего органического модификатора; $\Delta[A]$, $\Delta[AM]$, $\Delta[AS]$ – изменения концентрации аналита в трех фазах, которые вызваны присутствием органического модификатора в мицеллярном элюенте.

На основании уравнений (8) и (9) можно получить целый ряд механистических моделей в МЖХ [29], наиболее популярные из них приведены в табл. 1.

Таблица 1

Механистические модели удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии

Уравнение	№
$k = \frac{\phi K_1 [L_s] (1 + K_5 c_R)}{1 + (K_4 + K_5) c_R + K_2 c_S (1 + K_4 c_R) + K_4 K_5 c_R^2}$	(10)
$k = \frac{K_{SW} (1 / (1 + K_{AD} \phi))}{1 + K_{MW} ((1 + K_{MD} \phi) / (1 + K_{AD} \phi)) c_S}$	(11)
$k = \frac{K_{SW} (1 / (1 + K_{AD1} \phi + K_{AD2} \phi^2))}{1 + K_{MW} ((1 + K_{MD} \phi) / (1 + K_{AD1} \phi + K_{AD2} \phi^2)) c_S}$	(12)
$k = \frac{K_{SW} ((1 + K_{SD} \phi) / (1 + K_{AD} \phi))}{1 + K_{MW} ((1 + K_{MD} \phi) / (1 + K_{AD} \phi)) c_S}$	(13)
$k = \frac{K_{SW}}{1 + K_{MW} ((1 + K_{MD1} \phi + K_{MD2} \phi^2) / (1 + K_{AD1} \phi + K_{AD2} \phi^2)) c_S}$	(14)

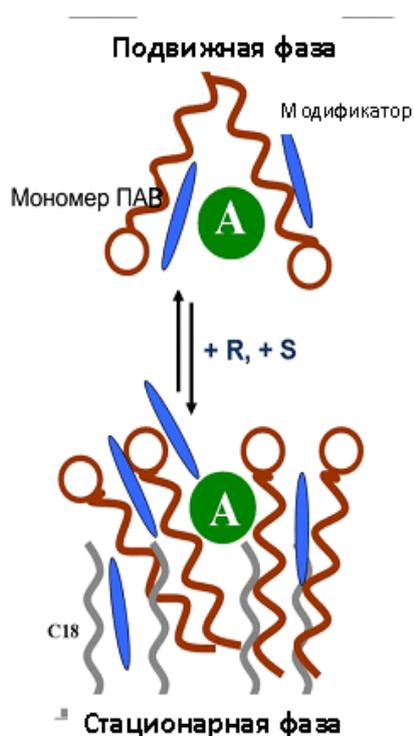
Восемь различных механистических моделей удерживания были сопоставлены в работе [32] на данных по удерживанию шести тестовых соединений с использованием подвижных фаз, которые содержали: ДСН и 1-пропанол; ДСН и 1-пентанол; ДСН и ацетонитрил или тетрагидрофуран. Среди протестированных уравнений модель (13) всегда хорошо описывала хроматографические данные, а модель (14) давала наилучшие результаты при использовании ацетонитрила и тетрагидрофурана [32].

Ряд механистических и эмпирических уравнений включены в программный пакет MICROM (см. ниже), предназначенный для интерпретативной оптимизации разделения в МЖХ [33].

Однако все упомянутые модели базируются только на допущениях о влиянии органического модификатора на удерживание в МЖХ. Для мицеллярных подвижных фаз, которые одновременно содержат ПАВ и органический модификатор, отсутствует физико-химическая модель удерживания.

Модель удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии на основе квазихимической концепции мицеллообразования

Одна из моделей удерживания в ОФ-ВЭЖХ была предложена Мураками [34]. В соответствии с ней акт сорбции-десорбции сопровождается изменением количества



молекул растворителя в сольватационной сфере солюта. По аналогии с этой моделью Логинова и др. [35, 36] рассмотрели, как изменяется микроокружение при переходе солюта из мицеллярной подвижной фазы на стационарную фазу, которая модифицирована мономерами ПАВ и молекулами органического растворителя-модификатора (рис. 2).

Изменение микроокружения солюта при распределении между подвижной и стационарной фазой можно рассмотреть как изменение количества мономеров ПАВ (S) и молекул органического модификатора (R) в ближайшем микроокружении солюта в соответствии с уравнением:

$$\langle AR_l S_n \rangle_m \rightleftharpoons \langle AR_p S_q \rangle_s + xR + yS, \quad (15)$$

где l, n, p, q – стехиометрические коэффициенты; $x = l - p$; $y = n - q$;

Рисунок 2. Схема изменения микроокружения солюта при переходе из подвижной фазы на стационарную

m и s – индексы, указывающие на подвижную и стационарную фазы, соответственно.

Коэффициенты x и y могут принимать положительные и отрицательные значения в зависимости от процессов при переносе солюта и его свойств.

Применяя закон действующих масс к уравнению переноса солюта (15), получаем следующее уравнение:

$$K = \frac{[AR_p S_q]_s [R]^x [S]^y}{[AR_l S_n]_m}, \quad (16)$$

где $[S]$ – молярная концентрация свободных мономеров ПАВ в подвижной фазе; $[R]$ – молярная концентрация молекул органического модификатора в подвижной фазе; $[AR_l S_n]_m$ – молярная концентрация солюбилизованного солюта в подвижной фазе; $[AR_p S_q]_s$ – молярная концентрация солюбилизованного солюта в стационарной фазе; K – константа закона действующих масс.

Фактор удерживания солюта k равен произведению коэффициента распределения на отношение объемов стационарной и подвижной фаз, т.е. фазовое отношение (ϕ):

$$k = \frac{n(A)_s}{n(A)_m} = \frac{[AR_p S_q]_s}{[AR_l S_n]_m} \phi, \quad (17)$$

где $n(A)_s$ – количество вещества солюта в стационарной фазе; $n(A)_m$ – количество вещества солюта в подвижной фазе.

Отношение $[AR_p S_q]_s$ к $[AR_l S_n]_m$ можно получить из уравнения (16):

$$\frac{[AR_p S_q]_s}{[AR_l S_n]_m} = K [R]^{-x} [S]^{-y}. \quad (18)$$

Принимая во внимание уравнения закона действующих масс для процессов мицеллообразования ПАВ и распределения органического модификатора между объемом водной фазы и мицеллами ПАВ (имеются в виду как мицеллы в объеме водной фазы, так и поверхностные микроагрегаты), можно получить следующее уравнение:

$$\lg k = \text{const} - x \lg c_R + y \beta \lg c_S + \\ + x \lg(1 + (P-1) \nu_S (c_S - \text{CMC})) + y \beta \lg(1 - \beta), \quad (19)$$

где $\text{const} = y \lg K' + \lg K + \lg \phi$; c_R , c_S – общие концентрации органического модификатора и ПАВ, соответственно, в элюенте; ν_S – молярный объем ПАВ; P – коэффициент распределения R между водой и мицеллярной псевдофазой; K' –

константа закона действующих масс для реакции мицеллообразования, β — степень связывания противоионов мицеллами ионного ПАВ, СМС — критическая концентрация мицеллообразования ПАВ.

Уравнение (19) можно использовать для описания удерживания в МЖХ при одновременном изменении как концентрации ПАВ, так и органического модификатора, однако для этого необходимы независимые данные о характеристиках мицеллообразования (β и СМС) в присутствии органических модификаторов, а также о связывании модификатора мицеллярной псевдофазой, которых недостаточно в литературе.

2 Оптимизация разделения в мицеллярной жидкостной хроматографии и обращенно-фазовой жидкостной хроматографии

Основным заданием каждого практикующего хроматографиста является разделение всех солютов за приемлемое время. На разделение в ВЭЖХ влияют многочисленные параметры (например, параметры колонки, характеристики ее упаковки, состав элюента, температура, тип буфера, рН, природа взаимодействия растворитель–солют). Это, с одной стороны, создает практически неограниченные возможности для разработки методик анализа, с другой стороны, это означает необходимость проведения большой экспериментальной работы, значительных расходов на оборудование и растворители и задержку в разработке методик, так как на сегодня теория жидкостной хроматографии не всегда позволяет заранее предсказать, как изменится разделение при изменении условий хроматографирования. Несмотря на то, что метод «проб и ошибок» достаточно часто приводит к неоптимальным условиям разделения, требует много времени и затрат, хроматографисты очень часто предпочитают пользоваться им и критически относятся к хемометрическим методам оптимизации разделения. Однако растущая потребность в надежных методиках анализа и необходимость разделять сложные смеси близких по свойствам соединений заставляют обращаться к математическим способам обработки данных при разработке методик хроматографического анализа.

2.1 Классификация подходов к оптимизации разделения в жидкостной хроматографии

Различают три типа процедур оптимизации в жидкостной хроматографии, которые используются наиболее часто: (i) последовательные, в которых не делают никаких предположений относительно зависимости удерживания солютов от состава подвижной фазы и оценивают качество каждой полученной хроматограммы; (ii) интерпретативные, в которых моделируют удерживание каждого солюта; (iii) процедуры оптимизации, в которых хроматографическую функцию отклика

строят, аппроксимируя значения глобальных критериев разделения, рассчитанных для каждой подвижной фазы.

В последовательных процедурах оптимизации каждый новый состав подвижной фазы выбирают на основе результатов, полученных для предыдущих подвижных фаз. Симплекс алгоритм [37] и его модификации [38-40] очень часто используют в таких процедурах для определения оптимальных условий разделения в ВЭЖХ и МЖХ [41-44]. Самым большим ограничением этого метода является отсутствие возможности проверить качество полученного оптимума. Однако этот метод является очень полезным, когда сложно определить связь между параметрами.

В отличие от последовательных процедур оптимизации, в интерпретативных процедурах эксперимент планируется до начала процедуры [45, 46]. Достоверность интерпретативных процедур оптимизации зависит от нескольких факторов [47]. Во-первых, это достаточно точное описание удерживания солютов. Более того, адекватные модели удерживания должны обеспечить как высокую описывающую способность, так и прогностическую способность во всем пространстве изменения параметров. Во-вторых, достаточно информативными должны быть элементарные критерии для оценки разделения каждой пары пиков. В-третьих, в некоторых случаях может оказаться очень важным адекватное описание формы индивидуальных пиков в зависимости от состава элюента. В-четвертых, общее разделение всех пиков на хроматограмме необходимо адекватно выразить одним числовым значением. Интерпретативные подходы являются более универсальными, однако требуют достаточно точного моделирования удерживания всех компонентов смеси.

В третьем классе процедур оптимизации качество разделения рассчитывают в каждой точке экспериментального плана, а затем строят функцию отклика путем полиномиальной аппроксимации полученных значений [48]. Преимущество такого подхода состоит в том, что в процедуры оптимизации можно включить значительное число параметров. Кроме того, нет необходимости знать физико-химические основы разделения и модели удерживания солютов. Основным недостатком такого подхода является значительное число экспериментов, которые необходимо провести для построения такой функции отклика.

2.2 Одновременная оптимизация условий хроматографирования по нескольким критериям

При оптимизации разделения очень часто необходимо находить компромисс между двумя основными критериями: достаточным разделением и длительностью хроматографирования. В последнее время к этим двум критериям добавился еще один, не менее важный – робастность разделения, т.е. стабильность характеристик разделения солютов при изменении условий хроматографирования.

Для оптимизации условий по нескольким параметрам в ВЭЖХ используют методы многокритериального выбора. Первым подходом к решению проблемы

одновременной оптимизации разделения и длительности хроматографирования стало получение хроматографической функции отклика (*CRF*) [43, 49]. Функция состоит из параметров, которые относятся к качеству и длительности разделения: $CRF = a \text{ "separation"} + b \text{ "time factor"}$, где a и b — весовые параметры. Этот подход интенсивно развивался Берриджем [43, 49, 50].

Компромисс между несколькими параметрами оптимизации можно найти с использованием так называемого «граничного подхода», в котором сначала выбирают все условия хроматографирования, для которых удается достичь достаточного разделения необходимых солютов, а затем среди них выбирают те, которые обеспечивают приемлемую длительность хроматографирования.

Многокритериальный выбор можно осуществить с использованием «функции желательности» (U_i) [51]. Функцию желательности можно строить на основании суммы отдельных критериев или их произведения. В первом случае при учете m критериев Y_j (Y_1, \dots, Y_m) функция желательности для i -того эксперимента имеет вид

$$U_i = \sum_{j=1}^n W_j Y_{ij}, \text{ где важность каждого критерия измеряется весовым коэффициентом } W_j.$$

Одним из вариантов функции желательности на основе произведения критериев является функция желательности Дерринжера, названная по имени своего изобретателя [52]. Для объединения критериев каждый из них трансформируется в безразмерную шкалу, а затем значение функции желательности Дерринжера рассчитывается как произведение трансформированных значений каждого из критериев. Полученная величина изменяется от 0 для неподходящего до 1 для подходящего значения, когда последующее улучшение не имеет смысла.

Парето-оптимизация [53] также относится к методам многокритериального выбора. Эксперимент является Парето-оптимальным, если нет других экспериментов, где улучшено значения хотя бы одного из критериев без ухудшения результатов для остальных критериев.

В работе [54] были сопоставлены известные методы многокритериального выбора. Авторы пришли к выводу, что все методы имеют свои преимущества, и выбор одного из них зависит от опыта хроматографиста и решаемой проблемы.

Известно лишь несколько работ по одновременной оптимизации селективности, длительности разделения и робастности в ВЭЖХ [55, 56]. Для МЖХ, насколько нам известно, такие процедуры разработаны не были.

Коммерчески доступные программы для оптимизации разделения в высокоэффективной и мицеллярной жидкостной хроматографии

Подходы к оптимизации разделения в ОФ-ВЭЖХ реализованы в нескольких известных коммерческих программных продуктах таких как PREOPT-W [57-60]; DryLAB [61-63]; OSIRIS [55]; MICHROM [23] ChromSword (Dr. Galushko Software

Entwicklung, <http://www.chromsword.de>). Среди них программы OSIRIS и DryLab наиболее часто используют в практике ОФ-ВЭЖХ для оптимизации разделения.

OSIRIS – это программный продукт компании Datalys (<http://www.datalys.net>), в котором хроматографические характеристики (фактор удерживания, эффективность колонки, асимметрия пиков) солютов моделируют как функцию условий разделения. В программном пакете доступны пять процедур, позволяющих оптимизировать: рН подвижной фазы; температуру; состав подвижной фазы; состав подвижной фазы и температуру; состав подвижной фазы и рН. Процедуры, которые используются в программе, не доступны пользователям.

DryLab – это зарегистрированная торговая марка продукта компании Rheodyne LLC (www.rheodyne.com), которая появилась еще в 1986 году. Самые важные инновации и достижения в развитии теории хроматографии постоянно включают в этот продукт для улучшения качества оптимизации. Сейчас DryLab — это наиболее мощная программа со многими возможностями для разработки изократических/градиентных методов разделения в обращенно- или нормально-фазовом режиме хроматографирования. Она обеспечивает выбор доли «сильного» компонента при нормально-фазовом режиме хроматографирования; доли растворителя при изократическом элюировании в ОФ ВЭЖХ; программы градиента; значения рН подвижной фазы; состава трехкомпонентной подвижной фазы при изократическом разделении; ионной силы; температуры для изократического разделения и т.д.

Программа MICHROM была разработана Торрес-Лапасио и др. [23] специально для оптимизации разделения в МЖХ, однако она может быть использована для оптимизации состава подвижной фазы и в ОФ-ВЭЖХ. MICHROM можно получить вместе с книгой [2]. Алгоритм, использованный авторами, включает моделирование удерживания каждого солюта на основе уравнений, которые следуют из трехфазной модели распределения солюта, расчет глобального разделения на хроматограмме с использованием одного или нескольких доступных критериев и поиск оптимальных условий анализа при помощи симплекс-алгоритма.

3. Новый хемометрический подход для оптимизации разделения в мицеллярной жидкостной хроматографии

В этом разделе описан выбор критериев для оптимизации разделения в МЖХ и алгоритмы оптимизации. Результаты оптимизации разделения в МЖХ с использованием хемометрических методов будут представлены в следующей части. Необходимость разработки нового подхода к оптимизации разделения в МЖХ обусловлена тремя обстоятельствами:

(i) в МЖХ неприменима последовательная схема, которая используется в ОФ-ВЭЖХ для оптимизации изократического разделения, когда сначала устанавливают

необходимую элюирующую силу подвижной фазы, а затем при постоянной элюирующей силе регулируют селективность разделения;

(ii) известные из литературы способы оптимизации разделения в МЖХ не позволяют использовать новые модели и вводить статистические веса в явном виде;

(iii) существующие подходы в МЖХ не позволяют оптимизировать условия по таким важным характеристикам как длительность и робастность разделения.

В хроматографии сложилась практика определения робастности на стадии валидации методики, что не рационально, так как, если робастность методики окажется низкой, то поиск условий разделения необходимо начинать сначала.

3.1 Выбор критериев оптимизации и алгоритм оптимизации разделения в мицеллярной жидкостной хроматографии

При создании алгоритма были приняты во внимание три характеристики, которые необходимо оптимизировать: (i) селективность разделения; (ii) длительность разделения; (iii) робастность разделения.

Селективность разделения

Разделение пиков двух солютов зависит от эффективности и характеристик их удерживания в соответствии с уравнением:

$$R_s = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(t_{R1} + t_{R2})} \times \frac{\sqrt{N}}{2} = \frac{(k_2 - k_1)}{(k_1 + k_2 + 2)} \times \frac{\sqrt{N}}{2}, \quad (20)$$

где R_s — разрешение (степень разделения) пиков; t_{R1} и t_{R2} — времена удерживания первого и второго солютов; N — эффективность (число теоретических тарелок).

В уравнение (20) входит квадратный корень из эффективности, поэтому, для того чтобы увеличить разрешение вдвое, необходимо увеличить количество теоретических тарелок в четыре раза, что достаточно сложно при использовании одного и того же хроматографического оборудования. Практически важный способ управления селективностью связан с первым множителем в правой части уравнения. Его можно изменять за счет дифференцирующего влияния компонентов мицеллярного элюента на фактор удерживания каждого из солютов.

Элементарные критерии оценки селективности разделения

Нами были проанализированы различные критерии, которые используются для оценки разделения между двумя пиками на хроматограмме; такие критерии называют элементарными [64].

Прежде всего, в качестве критерия можно использовать непосредственно сам первый множитель уравнения (20), как часто делают при оптимизации в ВЭЖХ. Другие элементарные критерии, которые были предложены для оценки разделения

двух пиков, приведены в табл. 2. Величины, используемые для расчета критериев, показаны на рис. 3.

Большинство критериев построено таким образом, чтобы учесть неидеальную форму хроматографических пиков. Значительные искажения формы пиков часто встречались в начале развития МЖХ, когда способы улучшения эффективности и асимметрии пиков были недостаточно развиты, и отсутствовали представления о закономерностях разделения с мицеллярными элюентами [65].

Таблица 2

Элементарные критерии оценки разделения двух пиков на хроматограмме

Уравнение	№
$\alpha_{i,i+1} = \frac{k_{i+1}}{k_i}$	(21)
$\beta_{i,i+1} = 1 - \frac{1}{\alpha_{i,i+1}} = 1 - \frac{k_i}{k_{i+1}}$, де $k_{i+1} > k_i$	(22)
$R_S = 1 - \text{por}_{2.5} \frac{(b_1 + a_2)}{(k_1 - k_2)}$ для первого пика $R_S = 1 - \text{por}_{2.5} \frac{(b_{i-1} + a_i)}{(k_i - k_{i-1})}$ для последнего пика $\left\{ \begin{array}{l} R_S = 1 - \text{por}_{2.5} \frac{(b_{i-1} + a_i)}{(k_i - k_{i-1})} \\ R_S = 1 - \text{por}_{2.5} \frac{(b_i + a_{i+1})}{(k_{i+1} - k_i)} \end{array} \right\}$ для промежуточных пиков	(23)
$S_{i,i+1} = \frac{k_{i+1} - k_i}{k_i + k_{i+1} + 2} = \frac{t_{i+1} - t_i}{t_i + t_{i+1}}$	(24)
$P = \frac{f}{g}$	(25)
$V_{i,i+1} = 1 - \frac{h_1}{h_2}$	(26)
$FO = 1 - \frac{O'_i}{O_i}$	(27)

Отношение *высота-глубина* (уравнение (25), рис. 3), предложенное Кайзером [66], стало одним из первых, которые использовали для оценки разделения пиков на хроматограмме. В этом критерии g — интерполированная высота пика, а f —

глубина «седла» относительно интерполированной нулевой линии (рис. 3). Существует несколько модификаций этого элементарного критерия, однако все они связаны с отношением характеристик минимума между двумя пиками и высоты пиков. Например, при использовании критерия (26) необходимо определить точку между двумя пиками, в которой максимальным будет расстояние между линией, которая соединяет максимумы двух пиков, и базовой линией между двумя пиками (рис. 3). Однако использованием уравнения (25) и его модификаций приводит приблизительно к одинаковым характеристикам разделения двух пиков [67]. Очевидно, что значения этих критериев зависят от соотношения между площадями пиков.

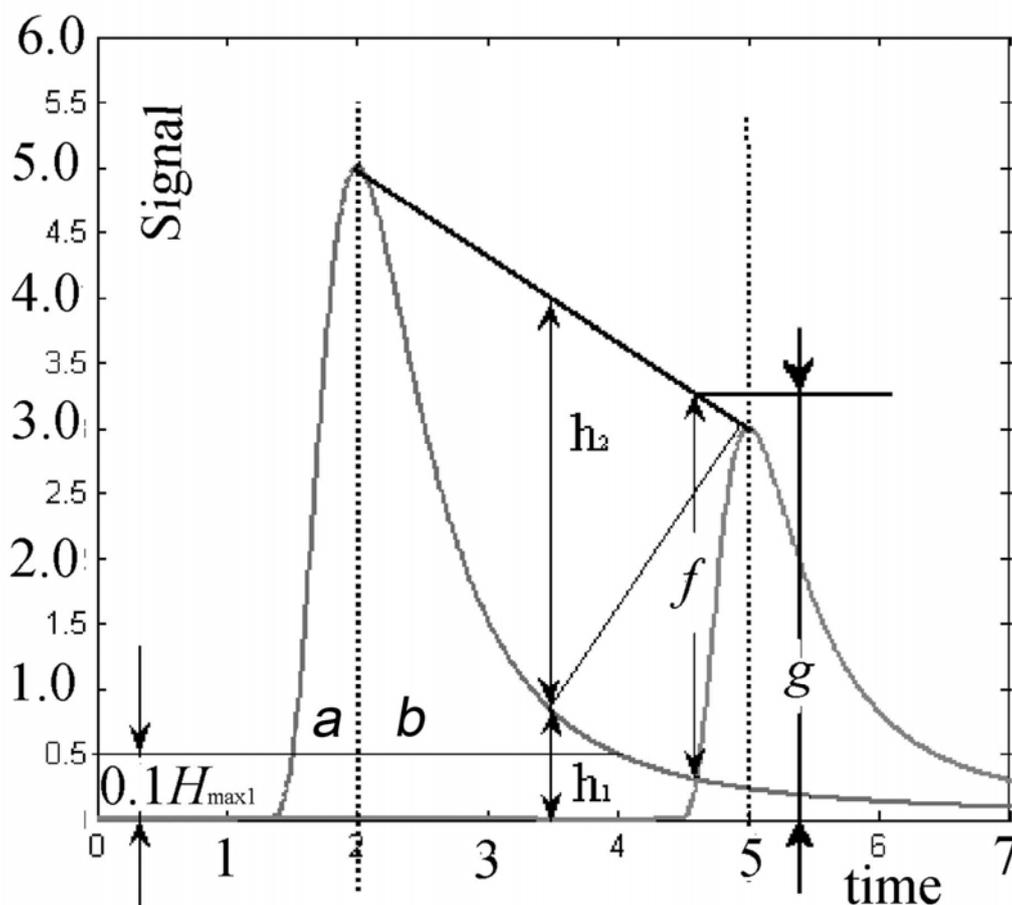


Рисунок 3. Характеристики пиков, которые используют для расчета элементарных критериев разделения

Использование *модифицированной степени разделения пиков* (критерий (23)) считается целесообразным, когда пики асимметричны [65]. Уравнения для расчета этого критерия для первого, последнего и промежуточных пиков приведены в табл. 2. Для промежуточных пиков рассчитывают два значения и принимают во внимание меньшее из двух. В этих уравнениях используются значения А и В, измеренные на 10 % высоты пика (рис. 3). Оператор $por_{2.5}$ трансформирует рассчитанные значения

следующим образом: если значение дроби оказалось меньше, чем 2.5, то его делят на 2.5, а если превысило 2.5, то его принимают равным 1. Значение 2.5 было выбрано как арбитражное значение, которое отвечает полному разделению пиков.

Критерий *чистота пика* определяется по уравнению (27). В этом уравнении O_i' обозначает часть площади *i*-того пика, которая перекрыта другими пиками; O_i — общая площадь *i*-того пика (рис. 4).

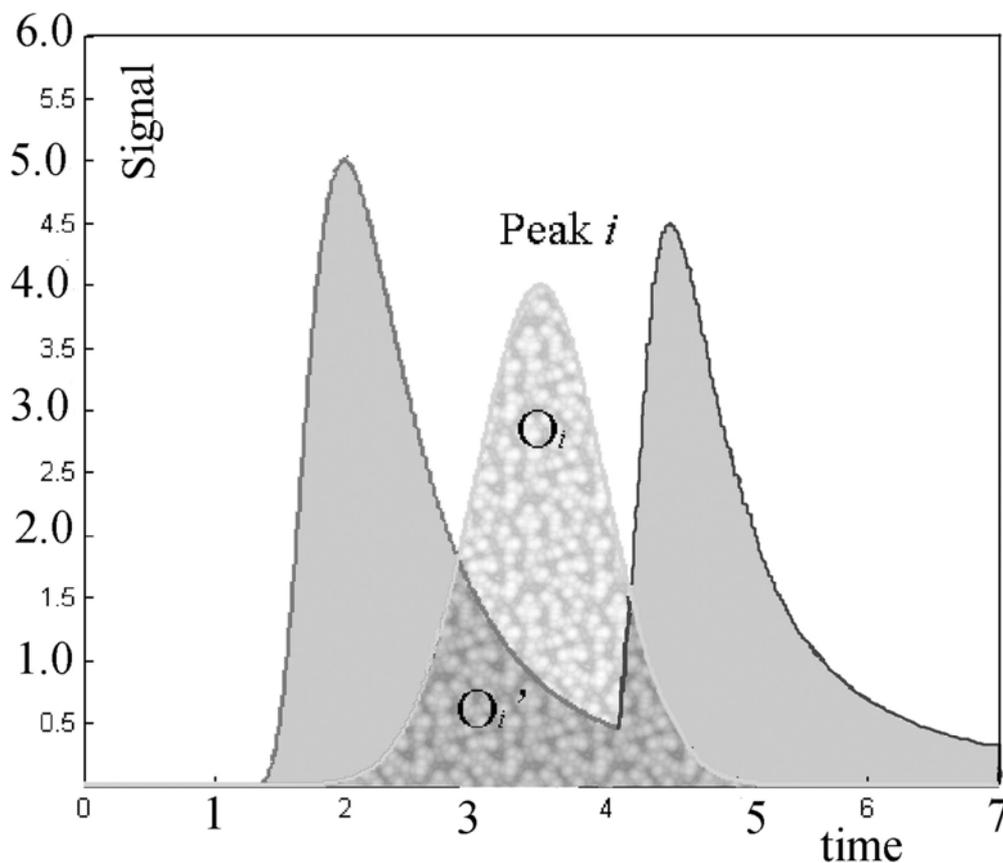


Рисунок 4. Параметры хроматограммы, которые используют для расчета критерия чистоты пика

Сопоставление различных элементарных критериев в МЖХ было проведено Торрес-Лапасио и др. [23] еще в начале развития интерпретативных процедур оптимизации. Авторы пришли к выводу, что критерии, которые учитывают форму пиков, более приспособлены для оптимизации разделения в МЖХ чем те, которые учитывают только положение пиков. В работе [68] сопоставлены четыре элементарных критерия при обработке данных об удерживании 13 веществ с использованием мицеллярных подвижных фаз на основе ДСН, модифицированных ацетонитрилом. Описание формы пиков проводили при помощи полиномиально-модифицированной Гауссовой функции [69]. Авторы сделали вывод, что выбор

элементарного критерия существенно влияет на результаты оптимизации и, как следствие, может привести к неверным выводам об оптимальных условиях разделения. При использовании ацетонитрила в качестве модификатора мицеллярных подвижных фаз на основе ДСН большинство пиков были асимметричными, а потому наиболее полезным был признан критерий (27) и одна из модификаций критерия (26).

Таким образом, в МЖХ представляется целесообразным использование в качестве элементарного критерия разделения двух пиков выражение $S = \frac{k_2 - k_1}{k_1 + k_2 + 2}$ в случае, если формы пиков близки к идеальной или если отсутствуют данные для оценки эффективности и асимметрии каждого пика. Если такие данные есть, в качестве элементарного критерия целесообразно использовать разрешение пиков; уравнение для расчета разрешения асимметричных пиков имеет вид:

$$R_s = \frac{(t_{R,n} - t_{R,n-1})^2}{(w_n + w_{n-1})} = \frac{(t_{R,n} - t_{R,n-1})}{(b_n + a_{n-1})} = \frac{(t_{R,n} - t_{R,n-1})}{4 \left(\frac{t_{R,n}}{\sqrt{N_n}(1 + A_{S,n})} + \frac{t_{R,n-1} A_{S,n-1}}{\sqrt{N_{n-1}}(1 + A_{S,n-1})} \right)}, \quad (28)$$

где $t_{R,n}$ и $t_{R,n-1}$ — времена удерживания, N_n и N_{n-1} — эффективности, $A_{S,n}$ и $A_{S,n-1}$ — асимметрия двух соседних пиков; последняя вычисляется как отношение отрезков a и b для соответствующего пика (см. рис. 3).

Оценка селективности разделения на всей хроматограмме

Следующим важным шагом является объединение информации о разделении для всех пиков на хроматограмме в одно числовое значение, которое бы адекватно характеризовало качество хроматограммы. В табл. 3 представлены уравнения, которые часто используются для объединения информации о разделении между всеми парами пиков на хроматограмме.

Худшее значение элементарного критерия (уравнение (33)) часто используют вследствие простоты вычисления и понятное значение полученного результата. Проблемой при использовании *худшего значения элементарного критерия* состоит в том, что этот критерий учитывает разделение только между одной парой пиков. Но во многих случаях недостаточное разделение наблюдается не для одной, а для нескольких пар пиков, и необходимо одновременно оценивать разделение между всеми проблемными парами пиков.

Таблица 3

Глобальные критерии оценки селективности разделения на всей хроматограмме

Уравнение	Название	№
-----------	----------	---

$CRF = \sum_{i=1}^p R_i$ $CRF = \sum_{i=1}^p R_i + L^x - a T_M - T_L - b(T_0 - T_1)$ <p> T_0 – минимальное приемлемое время; T_1 – время удерживания первого пика; T_M – время удерживания последнего пика на исследованной хроматограмме; T_L – максимальное приемлемое время. </p>	<p>Сумма разделений</p>	<p>(29)</p>
$R = \left[\prod_{i=1}^p R_{i+1,i} \right]^{\frac{1}{p}}$	<p>Геометрическое среднее ненормализованного произведения элементарных критериев</p>	<p>(30)</p>
$R = \frac{\prod_{i=1}^p R_{i+1,i}}{\left[\left(\sum_{i=1}^p R_{i+1,i} \right) / p \right]^p}$	<p>Нормализованное на среднее произведение элементарных критериев</p>	<p>(31)</p>
$R = \prod_{i=1}^p R_i$	<p>Ненормализованное произведение элементарных критериев</p>	<p>(32)</p>
$R = \min(R_i), 1 < i < p$	<p>Худшее значение элементарного критерия</p>	<p>(33)</p>

В других случаях глобальные критерии являются комбинацией элементарных критериев разделения [47], что снимает проблему ограниченности критерия (33). Несколько глобальных и элементарных критериев было сопоставлено в работе [70] еще в 1983 г. Рассмотренные глобальные критерии основаны на суммировании элементарных критериев разделения [70]. Авторы пришли к выводу, что все изученные глобальные критерии недостаточно адекватно объединяют информацию элементарных критериев, поскольку дают неверные результаты в случае, когда при изменении условий хроматографирования меняется порядок элюирования соллютов [70].

Карда-Броч и др. [47] проанализировали глобальные критерии, которые чаще всего используют в МЖХ: *нормализованное на среднее произведение элементарных*

критериев (уравнение (31)), ненормализованное произведение элементарных критериев (уравнение (32)), геометрическое среднее ненормализованного произведения элементарных критериев (уравнение (30)) и худшее значение элементарного критерия (уравнение (33)). Критерий чистота пика (уравнение (27)) применяли как элементарный критерий для тестирования всех глобальных критериев. Тестирование проводили на данных по разделению следующих смесей веществ: (i) шесть диуретиков (подвижные фазы на основе ДСН без модификатора); (ii) три диуретика и пять β -блокаторов (подвижные фазы на основе ДСН, 1-пропанола и 0.5 % (по объему) триэтиламина при pH 3); (iii) семь флуоресцирующих диуретиков (подвижные фазы на основе ДСН, 1-пропанола, pH 3). Лучшим глобальным критерием для оценки хроматограмм признано *ненормализованное произведение элементарных критериев*; оценка хроматограм по этому критерию совпадала с мнением хроматографистов о качестве разделения на хроматограмме в целом.

Однако аргументы авторов в пользу именно этого критерия недостаточно убедительны. Сопоставление результатов оптимизации разделения смесей (i) и (iii) показывает, что область оптимальных условий анализа оказывалась одной и той же при использовании всех изученных критериев. Критика глобального критерия (31) в работе [47] возникла вследствие ошибочного выбора для его тестирования элементарного критерия *чистота пика*. Критерий (31) был предложен ранее для решения проблемы увеличения *ненормализованного произведения элементарных критериев* (32), сопровождающегося очевидным ухудшением разделения пар соседних пиков. Например, рассмотрим три пика, которые имеют значения $R_{S1,2} = R_{S2,3} = 0.9$, тогда $PR_S = 0.81$. Если состав элюента изменен таким образом, что время выхода первого пика остается неизменным, а два других пика смещаются так, что теперь $R_{S1,2} = 0.5$ и $R_{S2,3} = 2.0$, значение критерия PR_S увеличится до 1.00. Тогда создается впечатление, будто бы второй состав элюента лучше, чем первый, что не соответствует ни мнению хроматографиста, ни оценке разделения первого и второго пика по элементарному критерию R_S . В то же время противоречие не возникает, если оценивать хроматограммы по глобальному критерию (31): значение *нормализованного на среднее произведение элементарных критериев* при переходе от первой хроматограммы ко второй уменьшается от 1.00 до 0.64. Следовательно, преимущества глобального критерия (31) выявляются, если для тестирования использовать элементарный критерий *разрешение пиков* (23)(28).

Проблематичность использования глобального критерия (32) *ненормализованное произведение элементарных критериев* связана с тем, что при изменении состава подвижной фазы часто изменяются не только позиции пиков, но и время хроматографирования. В приведенном примере сумма элементарных критериев, ΣR_S , увеличивается от 1.8 до 2.5. Тогда очевидно, что, если на первой хроматограмме значения глобального критерия (32) равнялось 0.81, то для оптимальных условий при общем времени хроматографирования, соответствующем второй хроматограмме,

значение этого глобального критерия разделения может достичь 1.56, если $R_{S1,2} = R_{S2,3} = 1.25$.

Таким образом, выбор критерия глобального разделения следует проводить с учетом поставленных хроматографистом задач и требований к полученной хроматограмме.

Время разделения

На время удерживания солютов влияют три фактора: (i) коэффициент распределения солюта между подвижной и стационарной фазой; (ii) размеры колонки; (iii) скорость подвижной фазы.

Среди этих факторов размеры колонки важны при замене колонки, которую использовали для разработки методики, на колонку, которая будет использоваться для анализа в конкретной лаборатории. Однако в последнее время производители все чаще стандартизуют размеры колонок, частиц сорбента и их плотность упаковки, поэтому значительные изменения в общей длительности разделения при переходе от одной колонки к другой наблюдаются достаточно редко. Достаточно сложной проблемой остается разница в свойствах однотипных колонок разных торговых марок, но она больше проявляется в селективности, а не длительности разделения. Для решения этой проблемы развиты подходы к тестированию колонок и выявлению взаимозаменяемых колонок [71]. Недавно Куликовым и Галат было проведено сопоставление однотипных колонок на основе октадецилсиликагеля в условиях МЖХ и показано, что различия отдельных колонок меньше проявляются при использовании мицеллярных элюентов, чем при использовании водно-органических элюентов [72].

Скорость подвижной фазы МЖХ в большинстве случаев выбирают как компромисс между давлением в насосе и временем разделения, а поэтому увеличить скорость подвижной фазы не удастся через аппаратурные ограничения.

Чаще всего время разделения в жидкостной хроматографии регулируют, изменяя коэффициент распределения солюта между подвижной и стационарной фазой за счет изменения в свойствах подвижной фазы.

Однако селективность разделения и длительность могут быть связаны между собой. Как правило, разделение солютов улучшается при увеличении длительности разделения, тогда необходимо найти компромисс между качеством разделения и временем хроматографирования. Время хроматографирования становится особенно важным при рутинном использовании методик в серийных анализах, где сокращение времени хроматографирования всего на несколько минут может привести к значительной экономии рабочего времени и расхода компонентов подвижной фазы.

Найти объективное соотношение между качеством разделения, с одной стороны, и временем разделения, с другой, достаточно сложно, и эта задача требует определенного опыта. Однако длительность разделения можно включить в критерий оптимизации как отдельный член, важность которого регулируют, вводя весовой

множитель (например, уравнение (29)). В связи с этим и сам параметр, который характеризует длительность разделения, кажется адекватным вводить в качестве множителя, а не слагаемого, хотя и в последнем случае есть возможность использовать некоторый множитель, если требование ко времени хроматографирования является доминирующим.

Робастность разделения

Валидация методик химического анализа в соответствии с мировыми стандартами анализа предусматривает оценку их робастности [73]. Робастность — это устойчивость методики к малым изменениям в регулировании экспериментальных условий. В случае ВЭЖХ исследуют робастность по отношению к изменению следующих факторов: (i) pH подвижной фазы; (ii) концентрации компонентов подвижной фазы; (iii) различные колонки (различные поставщики или серии); (iv) температура; (v) скорость подвижной фазы.

Представляется целесообразным включить в процедуру оптимизации такие параметры, которые могли бы характеризовать робастность разделения. Это могло бы исключить возникновение ряда проблем на стадии валидации методик. Очевидно, что наибольшее влияние на робастность разделения будут оказывать факторы, которые связаны с характеристиками состава подвижной фазы – pH и содержание компонентов элюента.

Для включения в процедуру оптимизации необходимо, чтобы характеристики состава подвижной фазы являлись параметрами модели удерживания. Это позволит оценить изменение удерживания солута с изменением значения этого фактора.

Для оценки робастности разделения в МЖХ предложено использовать критерий, Rob_{ij} , который в каждой точке области варьирования состава подвижной фазы отвечает среднему арифметическому значению критериев разделения на хроматограммах, полученных при изменении состава подвижной фазы на один шаг по каждому из четырех направлений (уменьшение/увеличение содержания ПАВ/модификатора) (рис. 5):

$$Rob_{ij} = \frac{R_{i-1,j} + R_{i+1,j} + R_{i,j+1} + R_{i,j-1}}{4} \quad (34)$$

Этот критерий основан на подходе для оценки робастности, предложенном в работе [55], и имеет понятный физический смысл – робастность будет наименьшей в областях, где наблюдаются изменения в глобальном разделении, т.е. там, где разделение улучшается или ухудшается. С точки зрения робастности оптимальную подвижную фазу необходимо искать не там, где разделение резко улучшается, а в области, где на зависимости глобального разделения от состава элюента наблюдается плато с достаточно высокими значениями глобального критерия разделения.

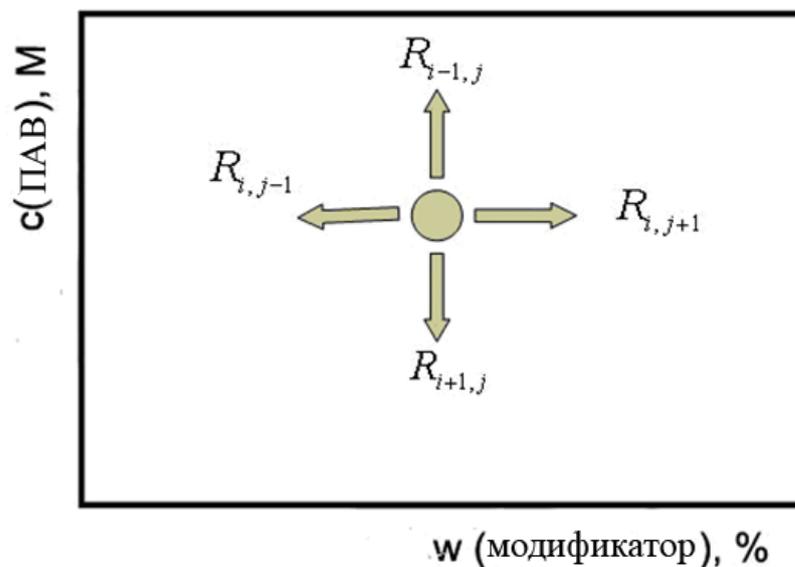


Рисунок 5. Четыре значения глобальных критериев разделения, которые используются для расчета робастности в точке R_{ij}

Алгоритм хемометрического подхода к оптимизации разделения в мицеллярной жидкостной хроматографии

Новый хемометрический подход к оптимизации разделения в МЖХ был реализован с использованием стандартного программного пакета Matlab 7.0. В общем, структуру алгоритма можно представить следующим образом:

- (i) сбор экспериментальных данных в соответствии с планом эксперимента;
- (ii) моделирование удерживания каждого компонента в смеси;
- (iii) моделирование эффективности и асимметрии каждого хроматографического пика в зависимости от состава элюента;
- (iv) оценка качества разделения;
- (v) оценка робастности полученного разделения;
- (vi) учет времени разделения как одного из критериев оптимизации;
- (vii) комбинация критериев, по которым проводилась оптимизация
- (viii) построение поверхности хроматографической функции отклика от состава подвижной фазы (chromatographic response function – *CRF*);
- (ix) нахождение оптимальных условий разделения на поверхности *CRF*.

План эксперимента, по которому получают первичные экспериментальные данные, определяется заранее, в соответствии с рекомендациями по адекватному планированию эксперимента при исследовании влияния нескольких факторов [74-76]. Для МЖХ наиболее приемлемым является использование факторного эксперимента с количеством факторов, которое равно количеству переменных в составе подвижной фазы, а количество уровней для каждого фактора зависит от диапазона изменения содержания компонентов в мицеллярном элюенте. Как свидетельствует опыт, самый

простой двухфакторный эксперимент с несколькими уровнями для каждого фактора в большинстве случаев является достаточным для построения моделей удерживания. Применение более полных симметричных планов, например, с 9 подвижными фазами, когда содержание ПАВ и органического модификатора изменяется на четырех и более уровнях, дает больше информации для оценки адекватности и прогностической способности моделей удерживания, а также позволяет смоделировать зависимость эффективности и асимметрии пиков от состава подвижной фазы.

После получения экспериментальных данных начинается их обработка (схема). Во-первых, на основании результатов параллельных измерений оцениваются дисперсии и рассчитываются статистические веса для каждого фактора удерживания [36, 64, 77], эти данные будут использованы для моделирования удерживания. Если надежные экспериментальные данные о дисперсии фактора удерживания отсутствуют, необходимо, по крайней мере, ввести статистические веса для учета эффекта линеаризации при использовании логарифмической функции фактора удерживания.

Данные о факторах удерживания каждого из солютов в смеси, матрицу состава подвижных фаз и матрицу статистических весов для каждого из факторов удерживания используют затем для моделирования. Качество моделирования оценивается на основе статистических критериев. Если для всех солютов модели признаны адекватными, то факторное пространство изменения содержания компонентов подвижной фазы разделяют на сегменты и рассчитывают удерживание каждого солюта в каждой точке факторного пространства. Очевидно, что этот этап является одним из самых важных, так как на нем базируется достоверность рассчитанного оптимума и выводов как о робастности разделения, так и длительности хроматографирования.

На основе рассчитанных данных об удерживании солютов проводят расчет величин, которые будут использованы как критерии оптимизации – факторов удерживания последнего пика в каждой точке факторного пространства, разделения между каждой парой пиков и матрицу значений глобального критерия разделения, а также матрицу значений робастности разделения. В случае, если известны значения эффективности и асимметрии каждого пика при использовании каждой подвижной фазы, проводят аппроксимацию полученных значений полиномами и расчет разделения между каждой парой пиков по уравнению (28).

Затем матрицы с этими данными, а также заданные хроматографистом пределы значений робастности и длительности хроматографирования, допустимых для данного разделения, используют для нормализации критериев в соответствии с функцией желательности Дерринжера:

$$\left. \begin{cases} D_{norm\ j} = 0 & \text{для } D_j \text{ "меньше чем" } D_{ju}; \\ D_{norm\ j} = 1 & \text{для } D_j \text{ "больше чем" } D_{jd}; \\ D_{norm\ j} = (D_j - D_{ju}) / (D_{jd} - D_{ju}) & \text{за } D_{ju} < D_j < D_{jd}. \end{cases} \right\} \quad (35)$$

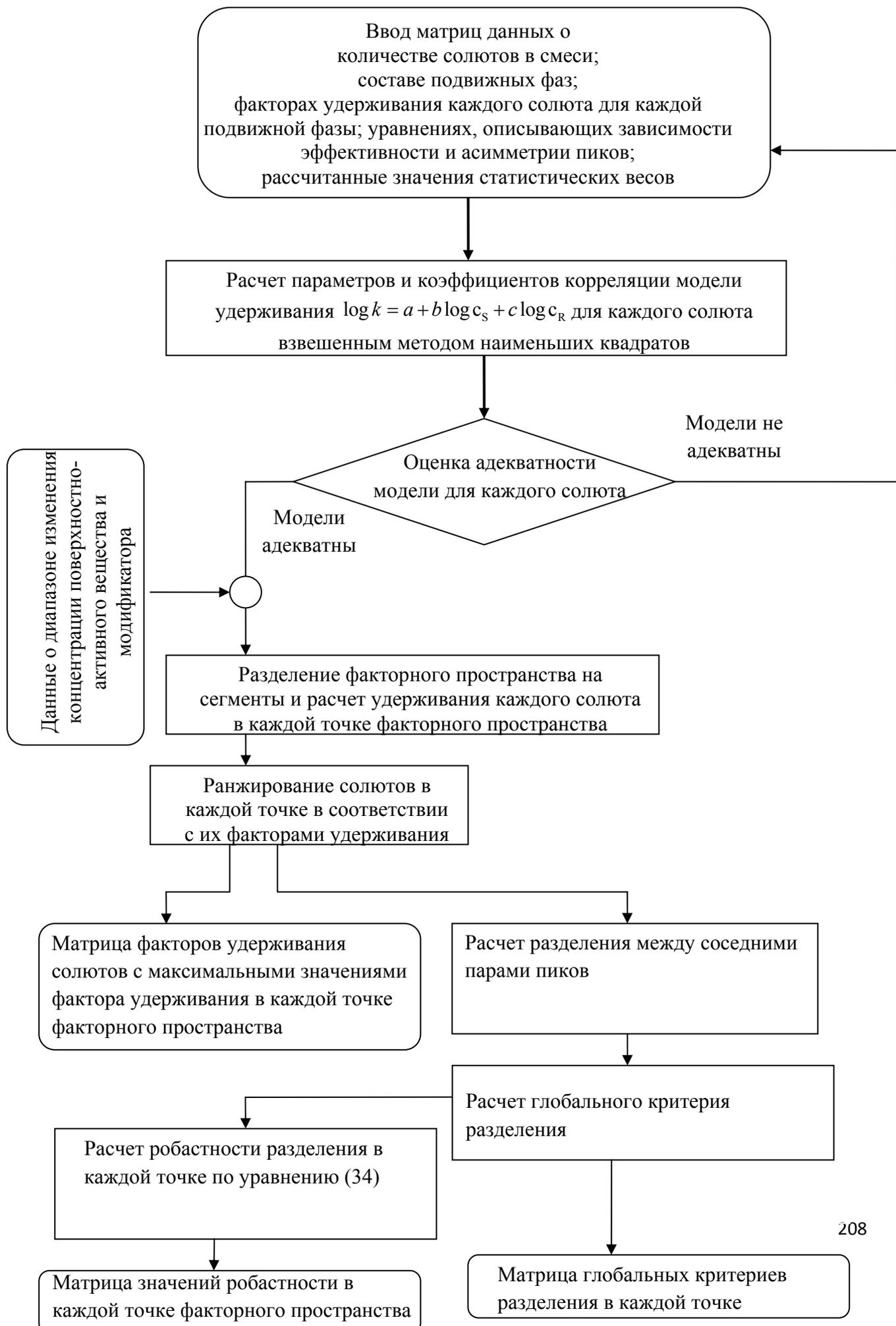
где $D_{norm,j}$ – нормализованное значение критерия R_{norm} , времени разделения, T_{norm} , или робастности, $Rugg_{norm}$, которые рассчитываются для каждой точки, на которые разбито пространство переменных; D_{ju} , D_{jd} – лимитирующие значения, которые отвечают приемлемой и неприемлемой величине критерия, соответственно.

После нормализации три критерия объединяют в одну хроматографическую функцию отклика, которая представляет собой геометрическое среднее критериев, например

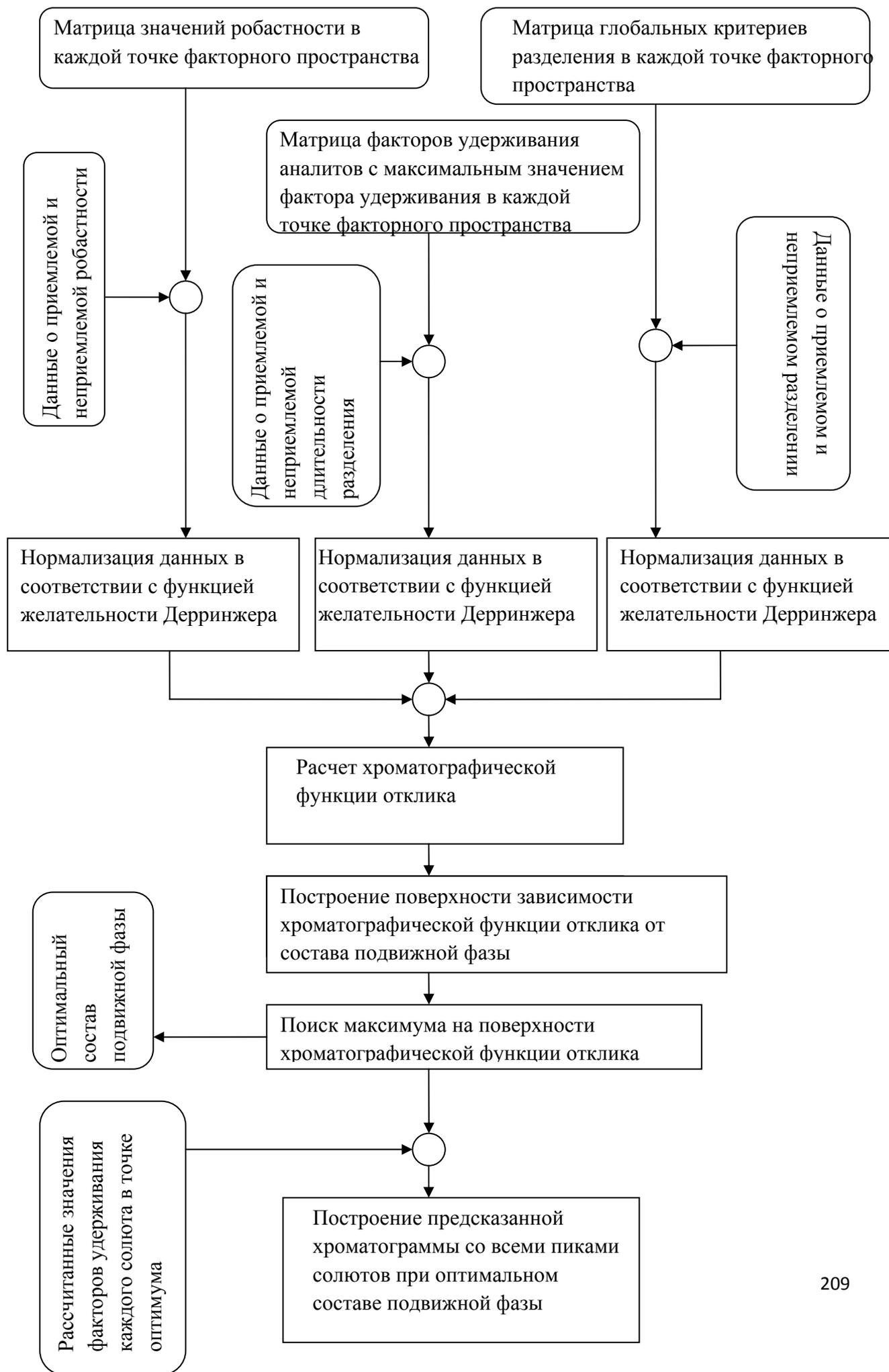
$$CRF_j = (R_{norm,j} \times T_{norm,j} \times Rugg_{norm,j})^{1/3} \quad (36)$$

Зависимость хроматографической функции отклика от состава подвижной фазы является основным результатом процедуры оптимизации. На этой поверхности находят область максимума и выбирают на ней точку, в которой предсказано наилучшее разделение солютов. Полученный состав подвижной фазы используется для экспериментальной проверки соответствия оптимальной подвижной фазы параметрам оптимизации. Вчисленные для оптимального состава подвижной фазы значения факторов удерживания, эффективности и асимметрии пиков используют для моделирования пиков солютов и построения предсказанной хроматограммы, с которой сопоставляют экспериментальную. Если экспериментальная хроматограмма соответствует предсказанной, процедура оптимизации считается завершенной, а подвижная фаза рекомендуется для разработки методики анализа.

Схема алгоритма оптимизации разделения в МЖХ



продолжение Схемы алгоритма оптимизации разделения в МЖХ



4. Использование хемометрического подхода для оптимизации разделения в МЖХ

Описанный выше хемометрический подход использовался нами для оптимизации разделения 14 консервантов в продуктах питания и 14 флавоноидов [78, 79].

Оптимизация разделения 14 консервантов [79]

Для оптимизации разделения 14 консервантов методом МЖХ в изократическом режиме использовались экспериментальные данные об удерживании каждого из солютов при использовании 9 подвижных фаз. Мицеллярные подвижные фазы были приготовлены на основе додецилсульфата натрия с добавками 1-пентанола как модификатора. Концентрацию додецилсульфата натрия изменяли от 0.025 М до 0.075 М, а объемную долю 1-пентанола от 0.5 до 1.5 % (по объему). Для моделирования удерживания использовали предложенную нами ранее билигарифмическую зависимость [36, 64, 77, 80, 81]:

$$\lg k = a + b \lg c_S + c \lg c_R \quad (37)$$

где c_S , c_R – концентрации ПАВ и органического модификатора, соответственно.

Для моделирования использовали взвешенный метод наименьших квадратов с расчетом весов на основе правила распространения погрешностей. Оказалось, что удерживание всех веществ хорошо описывается уравнением (37). Коэффициенты корреляции для всех веществ были выше 0.98. В качестве элементарного критерия разделения использовалось уравнение (24), а в качестве глобального критерия – *нормализованное на среднее произведение элементарных критериев* (31). Удерживание последнего пика на хроматограмме использовали для оценки общего времени разделения. Для оценки робастности разделения использовали уравнение (34).

Из-за достаточно широкого диапазона изменения содержания ДСН и 1-пентанола в подвижных фазах время разделения смеси консервантов изменялось в широких пределах: от 33 до 130 мин. Очевидно, что разделение 14 компонентов более чем за два часа является неприемлемым для рутинных анализов. Поэтому учет времени разделения как одного из критериев оказалось важным для разработки методики хроматографического определения консервантов в продуктах питания. Время разделения 30 мин было выбрано как приемлемое значение, а 100 мин как неприемлемое значение. На поверхности значений нормализованного критерия времени разделения (рис. 6) наблюдается его закономерный рост от левого нижнего угла с наименьшим содержанием ДСН и 1-пентанола до правого верхнего угла (рис. 6).

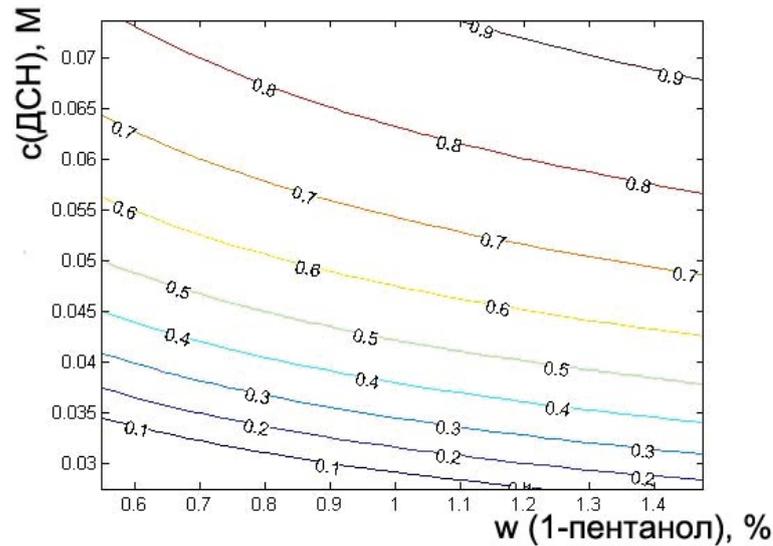


Рисунок 6. Зависимость нормализованного критерия времени разделения от состава мицеллярной подвижной фазы

Для нормализации глобального критерия разделения его наименьшее значение приняли как нежелательное, а наибольшее – за приемлемое. На рис. 7 представлена зависимость нормализованного глобального критерия разделения от состава мицеллярной подвижной фазы. Область, в которой наблюдается наилучшее разделение консервантов, отвечает достаточно широкому диапазону концентраций ДСН и 1-пентанола: от 0.035 М до 0.046 М и от 0.5 % до 1.1 %, соответственно (рис. 7).

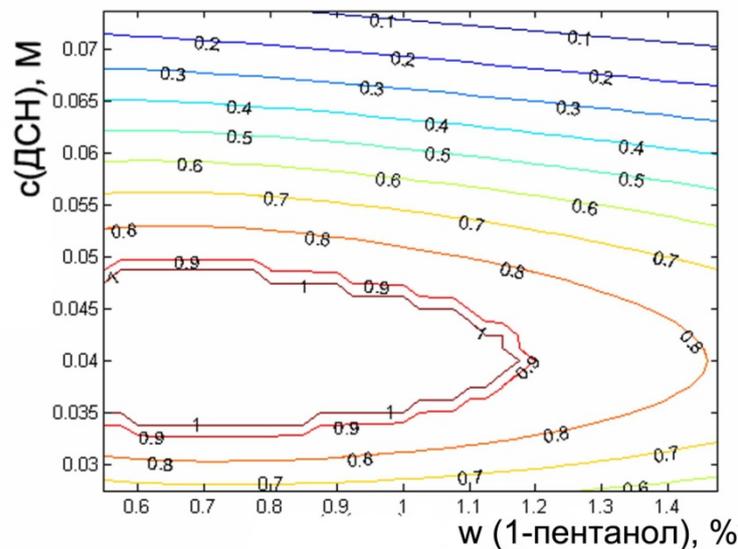


Рисунок 7. Зависимость нормализованного глобального критерия разделения (31) от состава подвижной фазы

Робастность разделения считали приемлемой, если во всем исследованном диапазоне изменения концентраций ДСН и 1-пентанола глобальный критерий разделения изменялся в пределах выделенного сегмента не более чем на 10 %.

Очевидно, что наименее устойчивыми к изменению состава подвижной фазы стали области состава, где наиболее заметно изменяется разделение на хроматограмме, т.е. области, которые расположены на склонах холма (рис. 8).

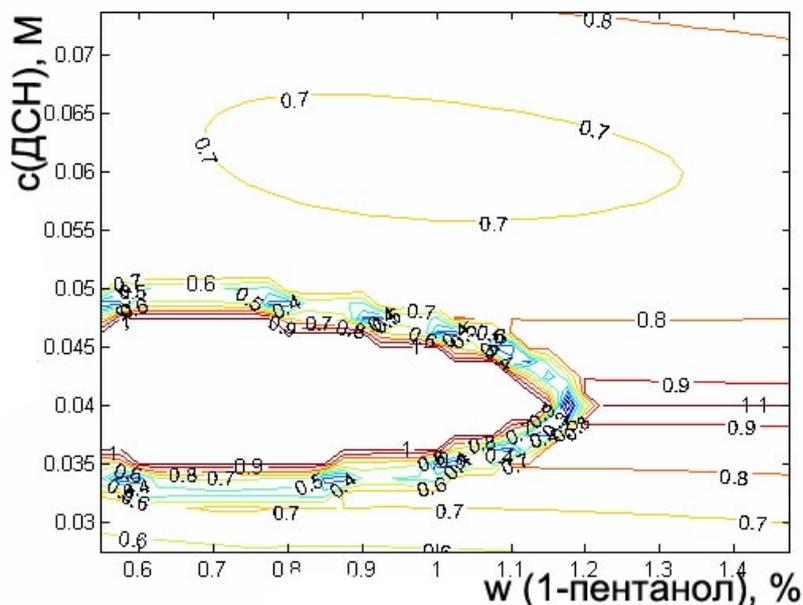


Рисунок 8. Зависимость нормализованной робастности от состава подвижной фазы

На контурной карте (рис. 9А) и поверхности (рис. 9Б) зависимости CRF от состава подвижной фазы, рассчитанной по уравнению (36), видно, что область оптимальных подвижных фаз значительно сужается после учета критериев времени разделения и робастности разделения.

Подвижную фазу, содержащую 0.045 М ДСН и 1.0 % 1-пентанола при рН 2.5 (0.1 % CCl_3COOH) выбрали в качестве оптимальной для разделения всех консервантов в изократическом режиме методом МЖХ.

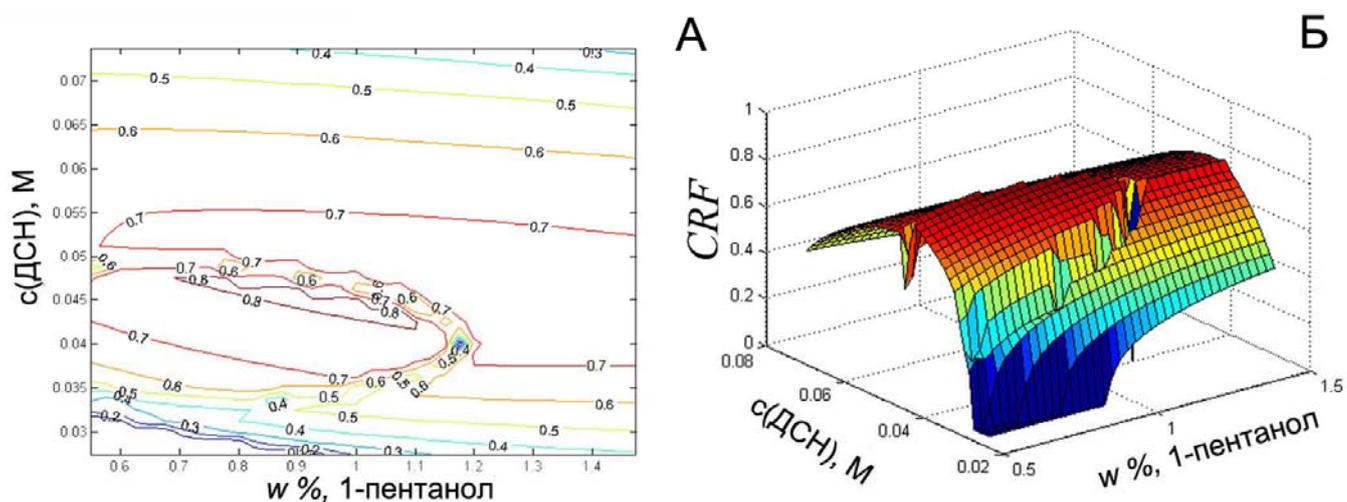


Рисунок 9. Контурная карта и поверхность зависимости хроматографической функции отклика CRF от состава элюента

Для оценки адекватности предложенного подхода по данным, полученным в ходе процедуры оптимизации, была построена предсказанная хроматограмма. Пики на предсказанной хроматограмме моделировались по уравнению Гаусса с использованием экспериментально полученных площадей пиков. Экспериментальная хроматограмма, полученная в оптимальных условиях, хорошо согласуется с предсказанной хроматограммой, что подтверждает адекватность выбранного подхода к оптимизации разделения в МЖХ (рис. 10).

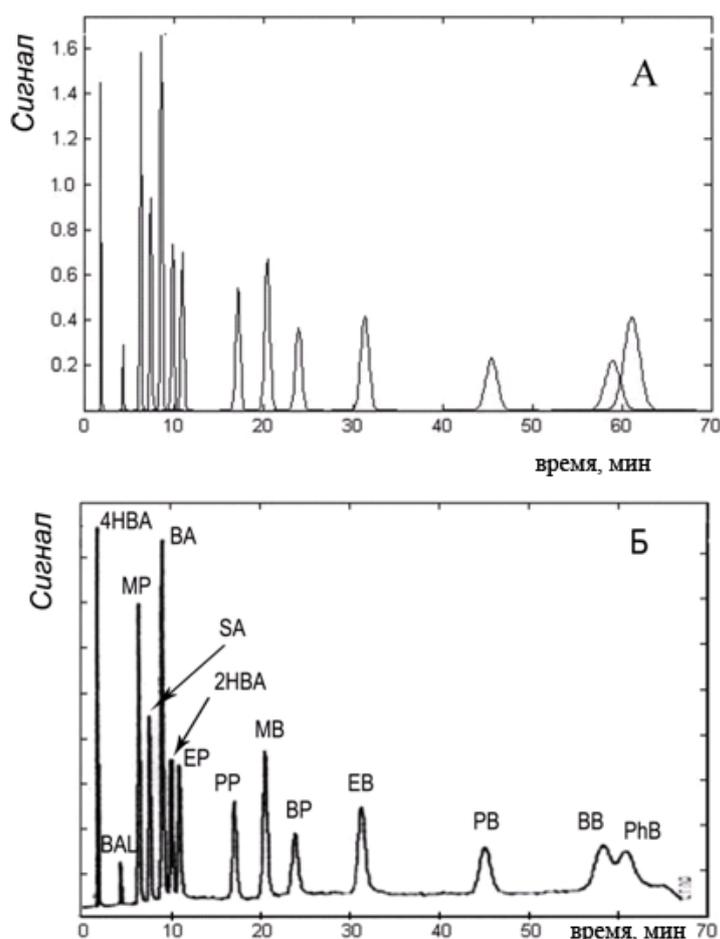


Рисунок 10. Предсказанная (А) и экспериментальная (Б) хроматограммы разделения 14 консервантов при оптимальных условиях разделения (подвижная фаза: 0.045 М ДСН, 1 % 1-пентанола (по объему), рН 2.55 0.1 % CCl_3COOH ; стационарная фаза: колонка Kromasil C18 (150 мм × 4.6 мм, 5 μм).

ВА – бензойная кислота; SA – сорбиновая кислота; 2НВА – 2-гидроксибензойная кислота; 4НВА – 4-гидроксибензойная кислота; МР – метиловый, ЕР – этиловый, РР – пропиловый, ВР – бутиловый эфиры 4-гидроксибензойной кислоты; PhВ – фенолбензоат; ВАL – бензиловый спирт; МВ – метилбензоат; ЕВ – этилбензоат; РВ – пропилбензоат; ВВ – бутилбензоат.

Оптимизация разделения 14 флавоноидов [78]

Разработанную интерпретативную процедуру оптимизации использовали для разделения 14 флавоноидов методом МЖХ. Для оптимизации разделения в изократическом режиме использовались экспериментальные данные об удерживании каждого из солютов при использовании 12 подвижных фаз. Мицеллярные подвижные фазы были приготовлены на основе додецилсульфата натрия с добавками 1-пропанола как модификатора. Концентрацию додецилсульфата натрия изменяли от 0.020 М до 0.040 М, а объемную долю 1-пропанола от 0.5 до 3.0% (по объему). Факторы удерживания рассчитывали на основании полученных времен удерживания и мертвого времени, измеренного как удерживание нитрата. Удерживание каждого флавоноида моделировали при помощи модели (37) с использованием взвешенного метода наименьших квадратов. Хорошая предсказательная способность этой модели была подтверждена нами ранее. В качестве элементарного критерия использовали критерий (24). В качестве глобального критерия использовали критерий (32). На рис. 11 представлены контурная карта и поверхность зависимости нормализованного глобального критерия разделения от состава элюента для разделения 14 флавоноидов. В соответствии с рис. 11, качество разделения возрастает при уменьшении содержания ДСН и модификатора, однако при этом увеличивается время разделения и ширина пиков. Рост селективности разделения также наблюдался за пределами экспериментально изученного диапазона изменения концентраций ДСН и 1-пропанола (рис. 11).

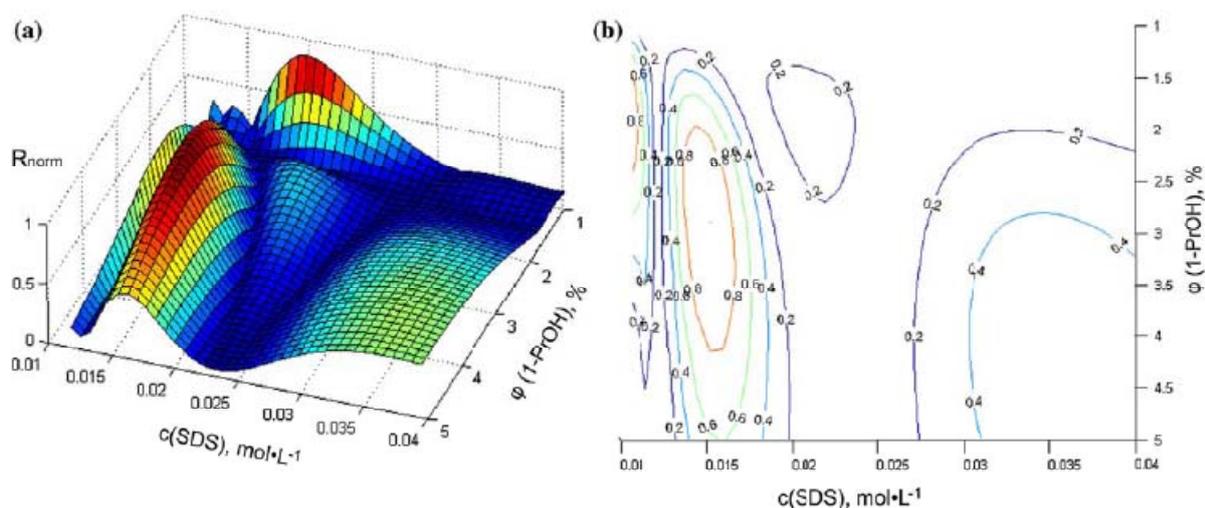


Рисунок 11. Контурная карта и поверхность зависимости нормализованного глобального критерия разделения от состава элюента при разделения 14 флавоноидов

При этом область с высокими значениями глобального критерия разделения находилась внутри диапазона концентрации ДСН от 0.014 до 0.018 М и объемной доли 1-пропанола от 2.2 до 4.5%. В этой области было получено несколько хроматограмм.

Оптимальными были признаны подвижные фазы с рН 6.9 следующего состава (i) 0.015 М ДСН и 3.0% (по объему) 1-пропанола, (ii) 0.018 М ДСН и 4.5% (по объему) 1-пропанола. На рис. 12 представлена экспериментальная и предсказанная хроматограммы, соответствующие центру диапазона оптимальных составов подвижной фазы, которые хорошо совпадают друг с другом.

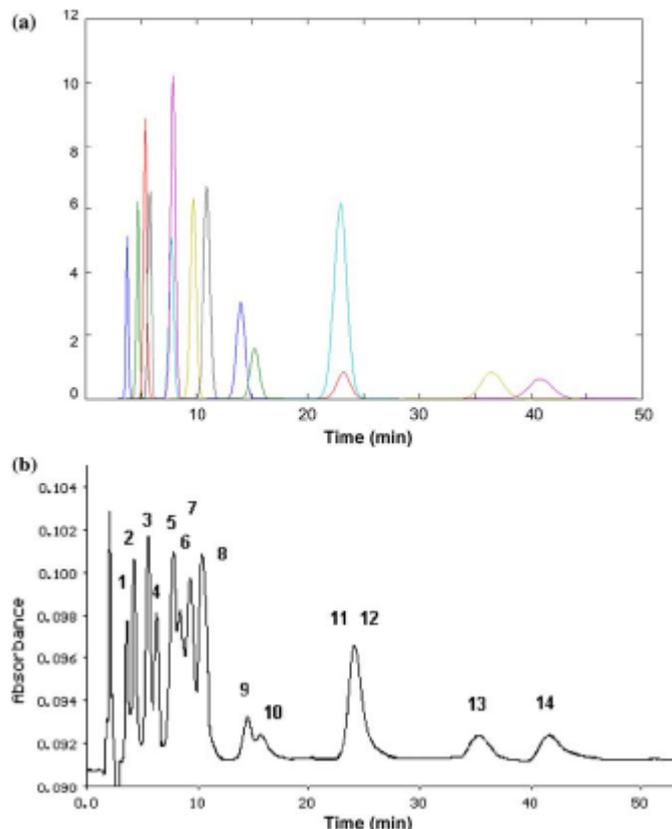


Рисунок 12. Предсказанная (А) и экспериментальная (Б) хроматограммы разделения 14 флавоноидов при оптимальных условиях разделения (подвижная фаза: 0.015 М ДСН, 3 % 1-пропанола)

стационарная фаза: колонка Ultrasphere ODS (250 мм × 4.6 мм, 5 μм).

- 1 – робинин (фларонин), 2 – рутин, 3 – гиперозид, 4 – кверцитрин, 5 – лютеолин-7О-глюкозид, 6 – ликурозид, 7 – апигенин-7О-глюкозид, 8 – изосалипурпозид, 9 – мирицетин, 10 – физетин, 11 – лютеолин, 12 – апигенин, 13 – кверцитин, 14 – кемпферол.

Литература

- [1] Braithwaite A., Smith F.J. *Chromatographic Methods*. Kluwer Academic Publishers, (1999)
- [2] Berthod A., García-Alvarez-Coque M.C. *Micellar Liquid Chromatography*. New York, Basel: Marcel Dekker, (2000)
- [3] Berthod A., Ruiz-Ángel M.J., Carda-Broch S. *Ionic liquids in separation techniques*. **J. Chromatogr. A** 1184(1-2) (2008) 6-18.
- [4] Berthod A., Laserna J.J., Carretero I. *Oil-in-water microemulsions as mobile phases for rapid screening of illegal drugs in sports*. **J. Liq. Chromatogr.** 15(17) (1992) 3115-3127.
- [5] Ruiz-Ángel M.J., Garcia-Álvarez-Coque M.C., Berthod A. *New insights and recent developments in micellar liquid chromatography*. **Sep. Purif. Rev.** 38(1) (2009) 45-96.
- [6] Diagono C.A., Ogawa C.A., Lanças F.M. *Evaluation of cyclodextrins as chiral selectors in the separation of selected monoterpenes by capillary liquid chromatography and capillary electrophoresis*. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 26(4) (2003) 505-516.
- [7] Kulikov A.U. *Determination of pyrethroid insecticide deltamethrin by micellar liquid chromatography with spectrophotometric detection*. **Chromatographia** 66(5-6) (2007) 303-309.
- [8] Kulikov A.U., Loginova L.P., Samokhina L.V. *Influence of various factors on the chromatographic behavior of cytostatic antibiotics of rubomicin derivatives in micellar liquid chromatography*. **Chromatographia** 57(7-8) (2003) 463-469.
- [9] Kulikov A.U., Verushkin A.G. *Development and validation of a micellar liquid chromatographic method with UV detection for determination of azithromycin in tablets and capsules*. **Chromatographia** 60(1-2) (2004) 33-38.
- [10] Kulikov A.U., Verushkin A.G. *Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, guaifenesin and preservatives in syrups by micellar LC*. **Chromatographia** 67(5-6) (2008) 347-355.
- [11] Kulikov A.U., Verushkin A.G., Loginova L.P. *Comparison of micellar and reversed-phase liquid chromatography for determination of sulfamethoxazole and trimethoprim*. **Chromatographia** 61(9-10) (2005) 455-463.
- [12] Kulikov A.U. *Determination of selenium(IV) in pharmaceuticals and premixes by micellar liquid chromatography*. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 43(4) (2007) 1283-1289.
- [13] Nishi H. *Pharmaceutical applications of micelles in chromatography and electrophoresis*. **J. Chromatogr. A** 780(1-2) (1997) 243-264.
- [14] *HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF ORGANIC AND INORGANIC ANIONS USING A MICELLARY MOBILE PHASE*. (1987) 87-97.
- [15] Okada T. *Micellar chromatography of inorganic compounds*. **J. Chromatogr. A** 780(1-2) (1997) 343-360.

- [16] Armstrong D.W., Nome F. *Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid chromatography*. **Anal. Chem.** 53(11) (1981) 1662-1666.
- [17] Arunyanart M., Cline Love L.J. *Model for micellar effects on liquid chromatography capacity factors and for determination of micelle-solute equilibrium constants*. **Analytical Chemistry**® 56(9) (1984) 1557-1561.
- [18] Foley J.P. *Critical compilation of solute-micelle binding constants and related parameters from micellar liquid chromatographic measurements*. **Anal. Chim. Acta** 231(2) (1990) 237-247.
- [19] Herries D.G., Bishop W., Richards F.M. *The partitioning of solutes between micellar and aqueous phases: Measurement by gel filtration and effect on the kinetics of some bimolecular reactions*. **J. Phys. Chem.** 68(7) (1964) 1842-1852.
- [20] Rodgers A.H., Strasters J.K., Khaledi M.G. *Simultaneous optimization of pH and micelle concentration in micellar liquid chromatography*. **J. Chromatogr.** 636(2) (1993) 203-212.
- [21] Rodgers A.H., Khaledi M.G. *Influence of pH on retention and selectivity in micellar liquid chromatography: consequences of micellar-induced shifts of ionization constants*. **Anal. Chem.** 66(3) (1994) 327-334.
- [22] Torres-Lapasio J.R., Villanueva-Camanas R.M., Sanchis-Mallols J.M., Medina-Hernandez M.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *Modelling of the retention behaviour of solutes in micellar liquid chromatography with organic modifiers*. **J. Chromatogr.** 639(2) (1993) 87-96.
- [23] Torres-Lapasio J.R., Villanueva-Camanas R.M., Sanchis-Mallols J.M., Medina-Hernandez M.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *Interpretive strategy for optimization of surfactant and alcohol concentration in micellar liquid chromatography*. **J. Chromatogr. A** 677(2) (1994) 239-253.
- [24] Torres-Lapasio J.R., Medina-Hernandez M.J., Villanueva-Camanas R.M., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *Description of the retention behaviour of solutes in micellar liquid chromatography with organic modifiers: Comparison of two methods*. **Chromatographia** 40(5-6) (1995) 279-286.
- [25] Xie Y.L., Baeza-Baeza J.J., Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Ramis-Ramos G. *Modelling and prediction of retention in high-performance liquid chromatography by using neural networks*. **Chromatographia** 41(7-8) (1995) 435-444.
- [26] García-Alvarez-Coque M.C., Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J. *Modelling of retention behaviour of solutes in micellar liquid chromatography*. **J. Chromatogr. A** 780(1-2) (1997) 129-148.
- [27] Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J., García-Alvarez-Coque M.C. *Description of the retention behaviour in micellar liquid chromatography as a function of pH, surfactant and modifier concentration*. **J. Chromatogr. A** 769(2) (1997) 155-168.

- [28] Strasters J.K., Breyer E.D., Rodgers A.H., Khaledi M.G. *Simultaneous optimization of variables influencing selectivity and elution strength in micellar liquid chromatography. Effect of organic modifier and micelle concentration.* **J. Chromatogr.** 511((1990) 17-33.
- [29] Garcia M.A., Jimenez O., Marina M.L. *Comparison of the models describing the retention in micellar liquid chromatography with hybrid eluents for a group of benzene derivatives and polycyclic aromatic hydrocarbons.* **J. Chromatogr. A** 675(1-2) (1994) 1-11.
- [30] Jiménez B., Patterson D.G., Grainger J., Liu Z., González M.J., Marina M.L. *Enhancement of the separation selectivity of a group of polycyclic aromatic hydrocarbons using mixed cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography.* **J. Chromatogr. A** 792(1-2) (1997) 411-418.
- [31] Jiménez O., García M.A., Marina M.L. *A model describing the effect on retention of the addition of alcohols to the mobile phase in micellar liquid chromatography.* **J. Chromatogr. A** 719(1) (1996) 15-26.
- [32] Lopez-Grio S., Baeza-Baeza J.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *Modeling of the elution behavior in hybrid micellar eluents with different organic modifiers* **Anal. Chim. Acta** 381((1999) 275–285.
- [33] Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *Description of the retention behavior in micellar liquid chromatography as a function of pH, surfactant and modifier concentration* **J. Chromatogr. A** 769((1997) 155–168.
- [34] Murakami F. *Retention behaviour of benzene derivatives on bonded reversed-phase columns.* **J. Chromatogr. A** 178(2) (1979) 393-399.
- [35] Куликов А.Ю., Логинова Л.П., Самохина Л.В. *Мицеллярная жидкостная хроматография в фармацевтическом анализе.* **ФАРМАКОМ** 4(1) (2004) 22-52.
- [36] 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.
- [37] Spendley W., Hext G.R., Himsworth F.R. *Sequential application of simplex designs in optimisation and evolutionary operation.* **Technometrics** 4((1962) 441–461.
- [38] Walters F.H. *Sequential Simplex Optimization* Florida: CRC Press, (2000) 402.
- [39] Nelder J.A., Mead R. *A simplex method for function minimization* **Comput. J.** 7((1965) 308–313.
- [40] Routh M.W., Swartz P.A., Denton M.B. *Performance of the super modified simplex* **Anal. Chem.** 49((1977) 1422–1428.
- [41] Ghorbani A.R., Momenbeik F., Khorasani J.H., Amini M.K. *Simultaneous micellar liquid chromatographic analysis of seven water-soluble vitamins: Optimization using super-modified simplex.* **Anal. Bioanal. Chem.** 379(3) (2004) 439-444.
- [42] Berridge J.C. *Simplex optimization of high-performance liquid chromatography separations* **J. Chromatogr. A** 485((1989) 3-14.
- [43] Morgan S.L., Deming S.N. *Simplex optimization of analytical chemical methods* **Anal. Chem.** 46(9) (1974) 1170-1181.

- [44] Ryan P.B., Barr R.L., Todd H.D. *Simplex techniques for nonlinear optimization* **Anal. Chem.** 52(9) (1980) 1460-1467.
- [45] Garcia-Alvarez-Coque M.C., Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J. *Models and objective functions for optimization of selectivity in reversed-phase liquid chromatography* **Anal. Chim. Acta** 579((2006) 125–145.
- [46] Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *Levels in the interpretive optimization of selectivity in high-performance liquid chromatography: A magical mystery tour (Review)* **J. Chromatogr. A** 1120((2006) 308–321.
- [47] Carda-Broch S., Torres-Lapasio J.R., García-Alvarez-Coque M.C. *Evaluation of several global resolution functions for liquid chromatography.* **Anal. Chim. Acta** 396(1) (1999) 61-74.
- [48] Klein E.J., Rivera S.L. *A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of separation of analytical scale HPLC separations* **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 23((2000) 2097–2121.
- [49] Morgan B., Little D., Beard M. *An approach to risk assessment for gasoline pipelines.* **Pipes and Pipelines International** 41(5) (1996) 5-15.
- [50] Berridge J.C. *Unattended optimization of reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations using the modified simplex algorithm* **J. Chromatogr.** 244((1982) 1-14.
- [51] Fishburn P.C. *Utility Theory for Decision Making.* Huntington, NY: Robert E. Krieger Publishing Co. , (1970)
- [52] Derringer G., Suich R. *Simultaneous optimization of several response variables* **J. Qual. Technol** 12((1980) 214–219.
- [53] Chinchuluun A., Pardalos P.M., Migdalas A., Pitsoulis L. Eds. *Pareto Optimality, Game Theory and Equilibria. Series: Springer Optimization and its applications.* Springer (2008) 900.
- [54] Bourguignon B., Massart D.L. *Simultaneous optimization of several chromatographic performance goals using Derringer's desirability function* **J. Chromatogr.** 586((1991) 11–20.
- [55] Goga-Remont S., Heinisch S., Rocca J.L. *Use of optimization software to determine rugged analysis conditions in high-performance liquid chromatography.* **J. Chromatogr. A** 868((2000) 13-29.
- [56] Vanbel P.F., Tilquin B.L., Schoenmakers P.J. *Criteria for developing rugged high-performance liquid chromatographic methods.* **J. Chromatogr. A** 697((1995) 3-16.
- [57] Cela R., Leira E., Cabaleiro O., Lores M. *PREOPT-W: Off-line optimization of binary gradient separations in hplc by simulation - III. Phase 2 and the objective functions.* **Computers and Chemistry** 20(3) (1996) 285-313.
- [58] Cela R., Leira E., Cabaleiro O., Lores M. *PREOPT-W: Off-line optimization of binary gradient separations in hplc by simulation - IV. Phase 3.* **Computers and Chemistry** 20(3) (1996) 315-330.

- [59] Cela R., Lores M. *PREOPT-W: A simulation program for off-line optimization of binary gradient separations in HPLC-II. Data management and miscellaneous aspects of use.* **Computers and Chemistry** 20(2) (1996) 193-202.
- [60] Cela R., Lores M. *PREOPT-W: A simulation program for off-line optimization of binary gradient separations in HPLC - I. Fundamentals and overview.* **Computers and Chemistry** 20(2) (1996) 175-191.
- [61] Molnar I. *Computer design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software (Review).* **J. Chromatogr. A** 965((2002) 175–194.
- [62] Snyder L.R., Dolan J.W., Lommen D.C. *DryLab® computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development. I. Isocratic elution.* **J. Chromatogr.** 485((1989) 65-89.
- [63] Dolan J.W., Lommen D.C., Snyder L.R. *DryLab® computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development. II. Gradient elution.* **J. Chromatogr.** 485((1989) 91-112.
- [64] Boichenko A.P., Loginova L.P., Kulikov A.U. *Micellar liquid chromatography (Review). Part I. Fundamentals, retention models and optimization of separation* **Методы и объекты химического анализа** 2(2) (2007) 92-116.
- [65] López-Grío S.J., Vivó-Truyols G., Torres-Lapasio J.R., García-Alvarez-Coque M.C. *Resolution assessment and performance of several organic modifiers in hybrid micellar liquid chromatography.* **Anal. Chim. Acta** 433(2) (2001) 187-198.
- [66] Kaiser R. *Gas-chromatographie* Leipzig: Geest und Portig, (1960)
- [67] Схунмакерс П. *Оптимизация селективности в хроматографии.* Москва: Мир, (1989) 399.
- [68] Lopez-Grio S.J., Vivo-Truyols G., Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *Resolution assessment and performance of several organic modifiers in hybrid micellar liquid chromatography* **Anal. Chim. Acta** 433((2001) 187–198.
- [69] Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *A model for the description, simulation and deconvolution of skewed chromatographic peaks* **Anal. Chem.** 69((1997) 3822–3831.
- [70] Debets H.J.G., Bajema B.L., Doornbos D.A. *A critical evaluation of quality criteria for the optimization of chromatographic multicomponent separations.* **Anal. Chim. Acta** 151((1983) 131–141.
- [71] Lesellier E., West C. *Description and comparison of chromatographic tests and chemometric methods for packed column classification.* **J. Chromatogr. A** 1158(1-2) (2007) 329-360.
- [72] Kulikov A.U., Galat M.N. *Comparison of C18 silica bonded phases selectivity in micellar liquid chromatography.* **J. Sep. Sci.** 32(9) (2009) 1340-1350.

- [73] 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.
- [74] Монтгомери Д.К. *Планирование эксперимента и анализ данных*. Ленинград: Судостроение, (1980) 384
- [75] Зедгинидзе И.Г. *Планирование эксперимента для исследования многокомпонентных систем*. Москва: Наука, (1976) 390.
- [76] Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В. *Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий*. Москва: Наука, (1976)
- [77] 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.
- [78] Kulikov A.U., Galat M.N., Boichenko A.P. *Optimization of micellar LC conditions for the flavonoid separation*. **Chromatographia** 70(3-4) (2009) 371-379.
- [79] Loginova L.P., Kulikov A.U., Yakovleva E.Y., Boichenko A.P. *MLC determination of preservatives in cranberry foodstuffs*. **Chromatographia** 67(7-8) (2008) 615-620.
- [80] Boichenko A.P., Loginova L.P., Iwashchenko A.L., Kulikov A.U. *Statistical testing of adequacy and prediction capability of retention models in micellar liquid chromatography* Instrumental Methods of Analysis. Modern Trends and Applications, Iraklion, Crete, Greece (2005) 487.
- [81] 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.



Бойченко Александр Павлович (1982 г. рождения) изучал химию в Харьковском национальном университете имени В.Н. Каразина и в 2005 г. получил степень магистра. В 2008 г. под руководством проф., д.х.н. Л.П. Логиновой защитил в Харьковском университете кандидатскую диссертацию «Моделирование удерживания и оптимизация разделения в мицеллярной жидкостной хроматографии» по специальности аналитическая химия. С 2004 г. работает на кафедре химической метрологии Харьковского университета. В 2007 г. Проходил стажировку в Университете Клода Бернарда, Лион, Франция, а в 2008 г. в Университете г. Бредфордт, Великобритания, Университете г. Грьонинген, Нидерланды. В настоящее время научные интересы Бойченко А.П. включают моделирование процессов распределения и связывания в истинно двухфазных, хроматографических и ультрамикрорегетерогенных системах, количественные зависимости структура-свойство, разработку методов оптимизации хроматографического разделения, создание новых аналитических систем, равновесия в гетерогенных системах, хемометрику и химическую метрологию. Соавтор 2 патентов, 40 статей в украинских и международных журналах, более 80 тезисов докладов, нескольких научно-исследовательских проектов, получивших финансирование украинских и международных организаций.

E-mail: boichenko@univer.kharkov.ua

Web-page: <http://www-chemistry.univer.kharkov.ua/staff/boichenko>



Логинова Лидия Павловна (1950 г. рождения), д.х.н., профессор. Закончила химический факультет Харьковского государственного университета в 1972 г. В 1977 г. под руководством проф., д.х.н. Н.П. Комаря защитила кандидатскую диссертацию «Калибровка рСl- и рF-метрических установок» по специальности аналитическая химия. С 1975 г. работает на кафедре химической метрологии Харьковского университета, с 2002 г. заведует кафедрой. В 2001 г. защитила докторскую диссертацию «Ионометрия в многокомпонентных и организованных растворах: параметры электродного отклика и ионобufferные системы». Научные интересы Логиновой Л.П. включают: применение наноразмерных и наноструктурированных систем в химическом анализе; исследование и моделирование процессов распределения и связывания в истинно двухфазных и хроматографических системах и лиофильных наноразмерных дисперсиях; химическую метрологию; внедрение концепции неопределенности в химический анализ. Опубликовала свыше 150 научных статей, была соавтором 6 учебно-методических

зданий, учебного пособия (2003 г.), монографии (2008 г.), 4 патентов. Руководитель ряда научно-исследовательских проектов, получивших финансирование украинских и международных организаций. Руководитель 9 защищенных кандидатских диссертаций. Член Научного Совета НАН Украины по проблеме „Аналитическая химия”, член редколлегии журналов «Методы и объекты химического анализа», «Вестник ХНУ. Серия Химия», «Фармаком», работает в специализированном научном совете Д 64.051.14. Организатор и руководитель городского научно-практического семинара «Современные проблемы аналитической химии и химической метрологии».

Web-page: <http://www-chemistry.univer.kharkov.ua/staff/loginova>



Куликов Артем Юрьевич (1970 г. рождения), к.х.н., старший научный сотрудник. Закончил химический факультет Харьковского государственного университета в 1993 г. В 1997 г. под руководством проф., д.х.н. И.Г. Перькова и д.х.н. М.Г. Левина защитил кандидатскую диссертацию «Оптимизация условий жидкостной хроматографии при контроле качества некоторых лекарственных средств и субстанций» по специальности аналитическая химия. С 1995 г. работает в лаборатории фармакопейного анализа Фармакопейного комитета Украины, а с 2004 г. по совместительству работает на кафедре химической метрологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Научный интерес Куликова А.Ю. – развитие теоретических представлений и использование хроматографических и электрофоретических методов для аналитических целей и в фармацевтическом анализе. Опубликовал свыше 80 научных статей, учебное пособие (2011 г.). Руководитель 1 защищенной кандидатской диссертацией.