

НЕОПРЕДЕЛЕННОСТЬ ФАКТОРОВ УДЕРЖИВАНИЯ И ПЛОЩАДЕЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПИКОВ В МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.П. Бойченко¹, А.Л. Иващенко², Л.П. Логинова¹

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

² Испытательная аналитическая лаборатория, ООО “СТОМА”, ул. Ньютона, 3, Харьков 61105, Украина.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) за последние несколько десятилетий прошла путь от физико-химического метода, применяемого только для научных исследований из-за высокой стоимости выполнения единичного измерения и оборудования, до рутинного аналитического метода, без которого трудно представить современную лабораторию [1-7]. Став нормативным методом контроля качества продуктов питания [8, 9] и лекарственных средств [10, 11], медицинского анализа [12], экоаналитического контроля [8] и т.д., ВЭЖХ продолжает активно развиваться и совершенствоваться.

Особенно актуальным является обеспечение качества количественных хроматографических измерений, т.к. на основании результатов хроматографического анализа делаются выводы о качестве и соответствии требованиям целых партий продукции, а, следовательно, ошибочные результаты могут привести к колоссальным экономическим потерям.

В отличие от газовой хроматографии, в ВЭЖХ есть возможность значительно изменять свойства не только стационарной фазы, но и подвижной фазы. Варьирование свойств фаз привело к возникновению многочисленных разновидностей ВЭЖХ [13]. При этом оказалось, что варианты ВЭЖХ отличаются не только характеристиками разделения аналитов (обнаруживаемый или количественно определяемый компонент), но и техникой выполнения анализов, характеристиками погрешностей хроматографических параметров, воспроизводимостью результатов и т.д. Один из современных вариантов ВЭЖХ — мицеллярная жидкостная хроматография (МЖХ) [14]. Теория и практика МЖХ на протяжении последних нескольких лет активно развивается на кафедре химической метрологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина [15-31]. Неотъемлемой частью проведенных исследований в области МЖХ стало изучение метрологических характеристик метода [23, 25, 28]. В этом разделе представлены как результаты, уже опубликованные авторами ранее [23, 25, 28], так и неопубликованные данные о характеристиках неопределенности площадей хроматографических пиков в МЖХ, необходимые для оценки неопределенности результатов количественного анализа. Мы постарались

также показать необходимость исследования метрологических характеристик хроматографического разделения, проанализировав известные подходы к валидации хроматографических методик и оцениванию некоторых валидационных характеристик. Необходимость получения данных о неопределенности фактора удерживания показана на примерах моделирования удерживания и построения линейных зависимостей удерживание-гидрофобность.

1. Мицеллярная жидкостная хроматография как альтернатива обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

Возникновение мицеллярной жидкостной хроматографии в конце 70-х годов прошлого столетия может показаться практически случайным. Однако ее появление стало результатом интенсивного исследования процессов солюбилизации и применения самоорганизованных мицеллярных растворов поверхностно-активных веществ (ПАВ), называемых в современной литературе лиофильными наноразмерными дисперсиями, в нефтедобыче и мицеллярном катализе [32-34].

Пионером МЖХ стал Д. Армстронг, который в 70-х годах активно занимался органическим синтезом в условиях мицеллярного катализа и разделял продукты методом тонкослойной хроматографии. Оказалось, что присутствие мицелл ПАВ в реакционной среде влияет на разделение продуктов синтеза [14]. Необходимо, однако, отметить, что работам Армстронга по применению мицеллярных подвижных фаз в хроматографии предшествовала гораздо более ранняя работа Хериеса, Бишопа и Ричардса [35], которые использовали гель-проникающую хроматографию для определения коэффициентов распределения веществ между водной фазой и мицеллярной псевдофазой. Термин псевдофаза используется по отношению к мицеллам ПАВ, чтобы подчеркнуть их особенность по сравнению с обычными двухфазными системами: мицеллы ПАВ представляют собой наноразмерные динамические агрегаты, находящиеся в равновесии с мономерами ПАВ в объеме водной фазы [36, 37]. Эти агрегаты термодинамически стабильны и могут существовать в течение бесконечно долгого времени [38].

Применение ПАВ в хроматографических разделениях началось задолго до появления мицеллярной хроматографии. В конце 60-х - начале 70-х годов водные растворы ПАВ использовались в ион-парной хроматографии, которая продолжает развиваться и сейчас [39-42]. Особенностью ион-парной хроматографии является то, что концентрация ПАВ в подвижной фазе не превышает критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Поэтому количество адсорбированного на поверхности стационарной фазы ПАВ всегда ниже максимально возможного, а, следовательно, при изменении концентрации ПАВ в подвижной фазе происходит изменение свойств динамически модифицированной стационарной фазы. В отличие от ион-парной хроматографии в МЖХ разделения проводят после «насыщения» стационарной фазы мономерами ПАВ и молекулами модификатора, при этом принимается допущение, что

в дальнейшем при изменении концентрации ПАВ в подвижной фазе свойства стационарной фазы изменяются лишь незначительно. Принципиально отличается и влияние концентрации ПАВ в подвижной фазе на удерживание в ион-парной хроматографии и МЖХ. В МЖХ при увеличении концентрации ПАВ в подвижной фазе удерживание практически всегда уменьшается, что связано с увеличением числа мицелл в подвижной фазе и смещением равновесия стационарная фаза – подвижная фаза в сторону подвижной фазы. В ион-парной хроматографии удерживание ионов увеличивается при увеличении концентрации ион-парного агента в подвижной фазе. Это может быть связано с двумя процессами: (i) концентрация ион-парного агента на поверхности стационарной фазы увеличивается, что приводит к более сильному удерживанию противоположно заряженных аналитов; (ii) за счет увеличения концентрации ион-парного агента в подвижной фазе равновесие заряженный ион аналита – ионная пара сдвигается в сторону нейтральной ионной пары, которая сорбируется обращенно-фазовым сорбентом.

Неоспоримой заслугой Армстронга является то, что он впервые оценил значительные аналитические возможности хроматографических разделений с подвижными фазами, содержащими мицеллы ПАВ [43-45]. В течение нескольких лет Армстронг с соавторами показали возможность использования водных мицеллярных растворов анионных и катионных ПАВ, а также обращенных мицелл в нормально-фазовой и обращено-фазовой колоночной и тонкослойной хроматографии, а также разработал теорию мицеллярных хроматографических разделений, основанную на псевдофазной концепции мицеллообразования.

В начале 80-х годов произошел качественный скачок в развитии ВЭЖХ, который связан с разработкой достаточно надежных коммерчески доступных приборов. В это же время МЖХ активно развивалась как один из вариантов ОФ-ВЭЖХ, который может составить альтернативу традиционному варианту с использованием водно-органических подвижных фаз.

В настоящее время наблюдается стабильный интерес к МЖХ [46]. Анализ количества работ, которые ежегодно публикуются в этой области по данным наукометрической базы данных SCOPUS в период с 2005 г. по 2010 г. включительно приведен на рис. 1. Хотя необходимо учесть, что даже в этой базе данных представлены не все публикуемые журналы. В 2010 году по данным SCOPUS на конец сентября было опубликовано 21 статью [47-67], в 2009 году – 17 [46, 68-83], 15 статей [84-98] опубликовано в 2008 г., 18 статей [99-116] в 2007 г., 14 статей [117-130] в 2006 г. и 22 статьи [131-152] в 2005 г.

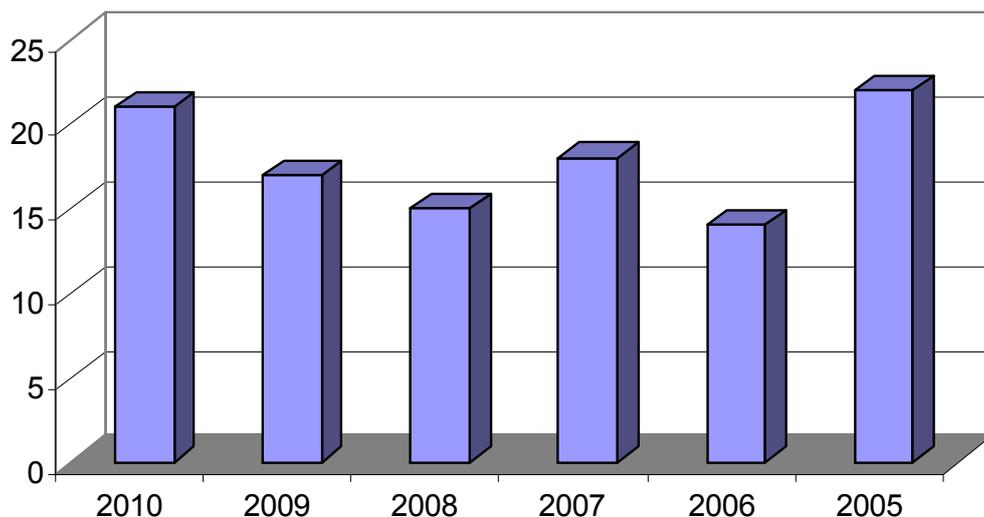


Рисунок 1. Гистограмма числа работ, опубликованных в области МЖХ за последние 5 лет по данным базы данных SCOPUS

Ежегодно публикуется около 18 работ в ведущих международных журналах. При этом приблизительно 50% работ связаны с разработкой и валидацией методик МЖХ анализа. Вторая половина работ посвящена применению МЖХ в физико-химических исследованиях. Данные об удерживании веществ, полученные при использовании в качестве мицеллярной подвижной фазы растворов неионного ПАВ – Бридж 35, нашли интересное применение в физико-химических и биомедицинских исследованиях. Они используются для предсказания активности лекарственных препаратов и их транспорта через биологические мембраны [67, 72-74, 83, 96, 98, 113, 115, 116, 127, 131, 136, 139, 145, 150, 153-182]. Необходимо отметить, что в подавляющем большинстве работ, опубликованных в области МЖХ, используется стандартное хроматографическое оборудование и обращено-фазовые колонки. Изучение возможностей МЖХ при использовании колонок с высокопористыми и другими менее распространенными сорбентами пока остается только предметом исследовательских работ [93, 111].

В последние несколько лет развивается новое направление МЖХ – высокосубмицеллярная жидкостная хроматография, в которой подвижные фазы содержат ПАВ выше ККМ и органический растворитель выше концентраций, сопоставимых с областью существования мицелл ПАВ [81, 91]. Возможности и преимущества этого метода только начинают изучаться.

Основные достижения в области МЖХ за последние годы были собраны в нескольких обзорах, опубликованных в 2009 г. авторами из Испании и Франции [46, 76, 80]. Оценивая активность различных научных коллективов в исследованиях в области МЖХ за последние 10 лет, можно утверждать, что эти же авторы, а также группа исследователей из США, продолжают вносить наибольший вклад в развитие

метода. Активно работают также научные коллективы из Украины, Грузии и Ирана. В последнее время появляется все больше публикаций авторов из Китая. Привлекательность метода для новых исследователей обусловлена его широкими возможностями, которые сочетаются с низкой стоимостью МЖХ анализа, что особенно важно для ученых из развивающихся стран.

О преимуществах МЖХ много раз было сказано как в наших работах, так и работах других авторов. Для более детального знакомства с методом и его особенностями мы рекомендуем обратиться к монографии [14], разделам в сборниках [183, 184], а также обзорам [140, 185-189]. Критический анализ преимуществ и недостатков МЖХ будет представлен во второй части нашего обзора в журнале «Методы и объекты химического анализа», где ранее была опубликована первая часть обзора, посвященная моделированию удерживания и оптимизации разделения в МЖХ [26].

В настоящее время очевидно, что МЖХ никогда не сможет полностью заменить ОФ-ВЭЖХ, однако во многих случаях она позволяет химику-хроматографу решить поставленные задачи гораздо быстрее и проще, чем при использовании ОФ-ВЭЖХ. Особенно важными преимуществами МЖХ является возможность одновременно разделять гидрофобные и гидрофильные соединения в изократическом режиме, а также напрямую вводить в обычную обращенно-фазовую колонку пробы биологических жидкостей. Так, например, только методом МЖХ удалось одновременно разделить в изократическом режиме водо- и жирорастворимые витамины [31]. МЖХ успешно применяется для анализа лекарственных препаратов, биологических жидкостей, продуктов питания и т.д. Ряд МЖХ методик уже стали нормативными при контроле качества лекарственных препаратов [190].

2. Валидация методик хроматографического анализа и оценка неопределенности результатов измерений

2.1 Общие сведения о концепции погрешностей и неопределенности

В этой работе 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 из 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 [191]) 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 [192].

Международный словарь основных и общих терминов в метрологии (International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, VIM), определяет термин «неопределенность» как «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») [193]. Таким образом, обычные для химиков характеристики разброса, такие как дисперсия, стандартное отклонение или относительное стандартное отклонение могут использоваться в качестве характеристик неопределенности. В наших предыдущих работах отмечалось, что концепция 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 [194, 195]. В качестве параметра, характеризующего неопределенность площади хроматографического пика, мы использовали величину относительного стандартного отклонения (ОСО).

Ниже представлены, как нам кажется, основные различия традиционной концепции погрешности и концепции неопределенности. Основопологающим понятием в концепции погрешностей является термин **погрешность**, который определяется как разница между индивидуальным результатом и истинным значением измеряемой величины. Такое определение предполагает, что результат, в принципе, может быть скорректирован на величину ошибки, что на самом деле невозможно. В концепции неопределенности отсутствует идеализированное понятие об истинном значении. Вследствие этого неопределенность всегда представляет собой некоторый интервал и не может быть использована для коррекции полученного результата. Широкое внимание к замене метрологических терминов оказалось полезным как для метрологов, так и для широкого круга химиков, столкнувшихся с необходимостью более тщательной оценки качества полученных экспериментальных данных. В целом, описание результатов измерений с использованием концепции погрешности и с использованием концепции неопределенности практически полностью совпадают. Вследствие этого замена терминологии не должна вносить смятение среди химиков.

Особенно важным для химиков представляется руководство EURACHEM (Европейское общество по аналитической химии)/CITAC (Международное сотрудничество по прослеживаемости измерений в аналитической химии) «Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях»

(Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement) [196], разработанное на основании общих рекомендаций по выражению неопределенности измерений GUM («Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement» [197-199]). В руководстве EURACHEM/CITAC [196], переведенном на несколько языков, представлено большое число примеров по расчету неопределенности реальных методик химического и физико-химического анализа.

2.2 Требования к валидации хроматографических методик

Общепринятым при разработке методик ВЭЖХ анализа является их валидация. В настоящее время термин валидация, согласно ГОСТ Р ИСО 9000-2001 «Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь», определяется как «подтверждение на основе представления объективных свидетельств того, что требования, предназначенные для конкретного использования или применения, выполнены» [200, 201]. В этом же документе даны определения понятия «объективное свидетельство» («данные, подтверждающие наличие или истинность чего-либо») и «требование» («потребность или ожидание, которое установлено, обычно предполагается или является обязательным»). В более узкоспециализированном документе ГОСТ Р 52361-2005 «Контроль объекта аналитический. Термины и определения» [202] термин «валидация» заменен на термин «Оценка пригодности методики анализа вещества [материала] (объекта аналитического контроля)», который определяется следующим образом: «подтверждение на основе представления объективных свидетельств того, что методика анализа вещества [материала] объекта аналитического контроля может быть применена для конкретного объекта или группы объектов».

Требования к валидации аналитических методик, а также руководства к оценке валидационных характеристик отличаются в разных странах, а также для различных областей химического анализа: фармацевтический анализ, анализ продуктов питания, биомедицинский анализ и т.д. [203]. Стремление к унификации процедур обеспечения качества химических измерений привело к появлению межгосударственных рекомендаций по валидации аналитических методик. Сопоставление различных руководств и предлагаемых в них подходов к валидации методик не являлось задачей данной работы, поэтому ниже мы остановимся лишь на кратком анализе руководств и рекомендаций, предлагаемых организациями с наиболее представительным международным участием: Международный союз по чистой и прикладной химии (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC), EURACHEM, Международная конференция по гармонизации (International conference on harmonization, ICH) и Ассоциация официальных аналитических химиков (Association of official analytical chemists, AOAC). Также ниже будут приведены определения основных валидационных характеристик.

В 1998 г. рабочая группа EURACHEM в составе представителей из Бельгии, Германии, Великобритании, Венгрии, Швеции, США, Нидерландов, Швейцарии, Дании, Чехии, Финляндии, Ирландии и Австрии разработали руководство по валидации аналитических методик [196а]. Руководство включает следующие основные характеристики, которые необходимо исследовать в процессе валидации: (i) селективность/специфичность; (ii) предел детектирования; (iii) предел определения; (iv) рабочий диапазон и диапазон линейности; (v) точность (правильность и прецизионность); (vi) чувствительность; (vii) робастность и (viii) извлечение. В руководстве указаны рекомендации по определению всех характеристик с указанием необходимого числа параллельных измерений, а также формул для расчета количественных характеристик.

Международная конференция по гармонизации, начиная с 1994 г., разрабатывает руководство по валидации методик фармацевтического анализа. Текст последнего варианта руководства [204], рекомендованный для утверждения официальными органами Европейского союза, Японии и США, достаточно общий и содержит лишь указания к определению валидационных характеристик: (i) специфичности; (ii) правильности; (iii) прецизионности; (iv) предела обнаружения; (v) предела определения; (vi) диапазона линейности; (vii) рабочего диапазона и (viii) робастности.

Ассоциацией официальных аналитических химиков (АОАС, Association of Official Analytical Chemists) в 2007 г. был подготовлен документ, включающий конкретные рекомендации по валидации методик анализа в соответствии с требованием ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» [192] (ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (IDT)). Интересно, что в самом документе термин валидация не используется, однако в п. 5.4.2 говорится о том, что методы (в соответствии с общепринятым определением – методики) можно использовать после определения их пригодности. Документ, подготовленный АОАС, включает не только описание подходов к определению валидационных характеристик, но, как и рекомендации IUPAC, процедуру для расчета неопределенности результатов [192]. В документе также содержатся рекомендации по определению каждой из валидационных характеристик, но только для методик, предназначенных для: (i) идентификации аналита; (ii) количественного определения аналита при низком его содержании; (iii) установления присутствия аналита выше или ниже определенного низкого содержания; (iv) количественного определения аналита при высокой концентрации; (v) установления присутствия аналита выше или ниже определенного высокого содержания.

В 2002 г. в журнале *Pure and Applied Chemistry* был опубликован технический отчет по вопросам внутрилабораторной валидации методик анализа, подготовленный группой, включающей представителей Великобритании, Норвегии, Австрии, Испании, Германии, Дании, США, Бельгии, Новой Зеландии, Португалии, Швейцарии и

Аргентины [205]. Как указывается в документе, он был подготовлен на основании рекомендаций EURACHEM, ICH и AOAC. В этом документе, в отличие от всех предыдущих, при установлении валидационных характеристик методики анализа используется понятие неопределенность. Это еще раз подтверждает стремление к унификации терминологии для представления результатов анализа на международном уровне. В гармонизированных рекомендациях подробно обсуждаются следующие валидационные характеристики: (i) применимость методики; (ii) селективность; (iii) градуировка и линейность; (iv) правильность; (v) прецизионность; (vi) извлечение; (vii) диапазон измерений; (viii) предел обнаружения; (ix) предел определения; (x) чувствительность; (xi) робастность; (xii) соответствие назначению; (xiii) варьирование матрицы; (xiv) определение неопределенности. Разработанный IUPAC документ стал основой недавно подготовленного руководства по валидации Национальной ассоциации технического надзора Австралии (NATA, National Association of Testing Authorities, Australia) [206], который также включает понятие неопределенность и аналогичные валидационные характеристики.

Ниже приведен список определений валидационных характеристик методик анализа, предлагаемых в нормативных документах, действующих на территории Российской Федерации: ГОСТ Р 52361-2005 «Контроль объекта аналитический. Термины и определения» [202]; ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов. Часть 1. Основные положения и определения» [207]; согласованные с ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 рекомендации РМГ 29-99 «Метрология. Основные термины и определения» с изменениями № 1 (2005 г.) [208]. Кроме того, авторами выполнен перевод дефиниций терминов, представленных в международных документах: JCGM 200:2008 «International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)» [193]; «IUPAC Gold Book» [209]; United States Pharmacopoeia (USP) [11] и публикациях Международной конференции по гармонизации (ICH) [204]. В Украине наиболее полным руководством по валидации методик является раздел в Государственной фармакопее Украины (Державній Фармакопеї України) «Валідація аналітичних методик і випробувань» [210], где приведены как дефиниции валидационных характеристик, так и рекомендации по их экспериментальной оценке. Ниже приведены названия валидационных характеристик и их определения.

Точность (accuracy) (ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [207]): Степень близости результата измерений к принятому опорному значению.

Правильность (trueness) (ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [207]): степень близости результата измерений к истинному или условно истинному (действительному) значению измеряемой величины или в случае отсутствия эталона измеряемой величины – степень близости среднего значения, полученного на основании большой

серии результатов измерений (или результатов испытаний), к принятому опорному значению. Показателем правильности обычно является значение систематической погрешности.

Прецизионность (precision) (ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [207]): степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных установленных условиях.

Повторяемость (repeatability) (ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [207]): прецизионность в условиях повторяемости. Наряду с термином "повторяемость" используют термин "сходимость", содержащийся также в п. 8.4 РМГ 29 и п. 3.6 VIM.

Условия повторяемости (сходимости) (repeatability conditions) (ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [207]): условия, при которых независимые результаты измерений (или испытаний) получаются одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

Воспроизводимость (reproducibility) (ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [207]): прецизионность в условиях воспроизводимости.

Условия воспроизводимости (reproducibility conditions) (ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [207]): условия, при которых результаты измерений (или испытаний) получают одним и тем же методом, на идентичных объектах испытаний, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования.

*Таким образом, точность включает правильность и прецизионность. Последняя, в свою очередь, делится на сходимость и воспроизводимость. При валидации методик анализа вместо воспроизводимости часто изучают характеристику **промежуточной прецизионности (intermediate precision)**: прецизионность при изменении условий внутри лабораторий: различные дни, аналитики, оборудование и т.д [204].*

Предел обнаружения (аналита) (ГОСТ Р 52361-2005 [202]): наименьшее содержание аналита, при котором он может быть обнаружен по данной методике анализа вещества или материала объекта аналитического контроля с заданной доверительной вероятностью.

Предел определения (аналита) (ГОСТ Р 52361-2005 [202]): наименьшее содержание аналита, которое может быть количественно определено с помощью

данной методики анализа вещества или материала объекта аналитического контроля с установленными значениями характеристик погрешности или неопределенности.

Диапазон определяемого содержания (аналита) (ГОСТ Р 52361-2005 [202]): область значений содержания аналита в пробе вещества или материала объекта аналитического контроля, которые могут быть определены по данной методике анализа вещества или материала.

Селективность (selectivity) (VIM [193]): свойство измерительной системы, используемой по установленной процедуре измерения, обеспечить измерение значений для одной или нескольких измеряемых величин таким образом, что значения каждой измеряемой величины не зависят от других измеряемых величин или других свойств изучаемого явления, тела или вещества.

Селективность (selectivity) (IUPAC [209]): выражение способности методики определять аналиты в смеси или в присутствии веществ матрицы без мешающего влияния компонентов с близким поведением.

В руководстве по валидации ИСН аналогичное определение используется для специфичности (specificity) [204]. Однако в рекомендациях IUPAC по использованию термина селективность четко указывается на недопустимость параллельного использования двух терминов, а специфичность определяется как предельный случай селективности.

Градуировка в химическом анализе вещества [материала] (объекта аналитического контроля) (calibration) (ГОСТ Р 52361-2005): Экспериментальное установление градуировочной характеристики в химическом анализе вещества [материала] объекта аналитического контроля.

Градуировочная характеристика (calibration function) (ГОСТ Р 52361-2005): Функциональная зависимость аналитического сигнала от содержания аналита, выраженная в виде формулы, графика или таблицы.

Как нам кажется, более точным является определение градуировочной характеристики (calibration function) представленное в «IUPAC Gold Book»: функциональное (не статистическая) соотношение для процесса химического измерения, связывающее результат измерения наблюдаемого сигнала или величины отклика с количеством аналита.

Линейность аналитической методики (linearity) (ICH): способность получить результат, который прямо пропорционален концентрации аналита в образце в пределах заданного диапазона, или который соразмерный концентрации посредством четко определенных математических преобразований.

Чувствительность (в анализе вещества и материала) (sensitivity) (ГОСТ Р 52361-2005): значение первой производной градуировочной характеристики при данном содержании аналита. Для линейной градуировочной характеристики чувствительность выражается значением тангенса угла наклона градуировочной прямой.

К сожалению, определения терминов робастность (устойчивость) и рагидность (прочность) в настоящее время отсутствуют как в нормативных документах международных организаций, так и в «IUPAC Gold Book». Проект IUPAC на 2003-2008 г. имел целью разработать четкие и однозначные определения этих терминов, чтобы избежать путаницы в различных областях аналитической химии, а также изучить возможности количественного выражения характеристик робастности и рагидности, однако проект не был завершен и остановлен в 2006 г. Наибольшую востребованность термины получили при валидации методик в фармацевтическом анализе. Поэтому ниже приведены определения из Фармакопеи США и ICH. В первом случае под терминами робастность (устойчивость) и рагидность (прочность) понимаются разные валидационные характеристики, во втором случае они используются как синонимы.

Робастность (устойчивость) (robustness) методики (USP, ICH): мера ее способности оставаться без изменений при небольших, но неслучайных изменениях в параметрах методики, которая показывает пригодность и надежность методики при нормальном использовании.

Рагидность (прочность) (ruggedness) (USP): степень воспроизводимости результатов, полученных при анализе одного и того же образца при варьировании условий анализа, таких как разные лаборатории, аналитики, аппаратура, партии реагентов, время проведения анализа, температура, дни и т.д. В такой формулировке, однако, значение термина рагидность совпадает со значением терминов прецизионность в условиях воспроизводимости и/или промежуточная прецизионность.

Для более детального знакомства с процедурами по определению робастности (устойчивости) и рагидности (прочности) мы рекомендуем обратиться к рекомендациям и обзору, а также статье в Фармакопее США.

В 2009 г. IUPAC инициировали проект создания словаря терминов по хемометрике «A glossary of concepts and terms in chemometrics» на основе wiki (http://www.iupacterms.eigenvector.com/index.php?title=Main_Page) – веб сайта, на котором каждый может вносить свои изменения и предложения [211]. По-видимому, в словарь войдут ряд дефиниций метрологических и валидационных характеристик.

Анализируя приведенные дефиниции валидационных характеристик, а также рекомендации по их практическому определению, можно утверждать, что для разработки и валидации методики химического анализа необходимы данные о неопределенности результатов, а также установленные закономерности влияния различных факторов на неопределенность измеряемых величин. В хроматографическом анализе наибольшее внимание уделяется параметру удерживания аналита, выражаемому через фактор удерживания (k), и площади хроматографического пика, которую используют для количественного анализа. Выявление факторов, влияющих на неопределенность хроматографических характеристик, позволит отказаться от метода проб и ошибок при разработке методик хроматографического анализа, обеспечивающих необходимую точность определения основных компонентов и примесей.

2.3 Исследование источников неопределенности в ВЭЖХ анализе

Существует два принципиально разных подхода к оценке неопределенности конечного результата химического анализа – восходящий (bottom-up) и нисходящий (top-down) [212]. Первый основан на выявлении всех источников неопределенности, составлении диаграммы Ишикавы [213], последующей оценке величин неопределенности, связанных со всеми источниками, и на их основе расчете расширенной неопределенности конечного результата [212]. Этот подход достаточно трудоемок, однако при правильном учете всех источников неопределенности позволяет не только адекватно оценить 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. [204]) 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, как правило, не предусматривают определения характеристик прецизионности в условиях 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.

Основным недостатком использования «нисходящего» подхода является отсутствие информации о вкладах отдельных источников неопределенности в общую неопределенность. Трудности в реализации «восходящего» подхода в хроматографии связаны с многостадийностью хроматографического определения и сложностью дифференциации различных источников неопределенности. Кроме того, проблемой при оценке неопределенности результатов хроматографического анализа в аналитических лабораториях является отсутствие четко написанных инструкций и руководств, учитывающих отраслевую специфику, а также отсутствие подходяще обученных специалистов в этой области даже на университетском уровне. Известно лишь ограниченное число работ по детальному исследованию источников неопределенности хроматографического анализа [214-231]. Так, Лейто и др. применили восходящий подход для оценки неопределенности определения симвастатина в таблетках [225]. Авторы выяснили, что наибольший вклад в расширенную неопределенность вносит стадия пробоподготовки (около 50 %), а использование градуировки по одной точке незначительно влияет на неопределенность результата анализа по сравнению с градуировкой по 5 точкам [225]. На примерах оценки неопределенности определения загрязнителей в осадках показано, что наибольший вклад в неопределенность вносят извлечение аналитов (на этапе пробоподготовки) и сходимости площадей хроматографических пиков [212]. Хибберт и др. [232] подробно изучили источники инструментальной неопределенности площади и высоты хроматографического пика в ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором. Оказалось, что наибольший вклад в неопределенность этих характеристик вносит неопределенность объема пробы [232]. В 1999 г. Барвик опубликовал прекрасный обзор, посвященный анализу факторов влияющих на неопределенность хроматографических характеристик в газовой хроматографии и ВЭЖХ [233].

Основными факторами, влияющими на неопределенность фактора удерживания в ВЭЖХ, является температура колонки, состав подвижной фазы, скорость подвижной фазы, а также интегрирование. Среди этих факторов наибольшее влияние оказывают температура и состав подвижной фазы, т.к. считается, что неопределенность скорости потока, составляющая для большинства коммерчески доступных хроматографов около 0.3 %, пропорционально передается к неопределенности факторов удерживания. Чтобы относительная неопределенность факторов удерживания при изократическом режиме не превышала 1 %, необходимо поддерживать температуру с неопределенностью менее 1 °С [233]. При градиентном элюировании требования к контролю температуры еще больше возрастают. Погрешность интегрирования

определяется в основном ограничениями программного обеспечения и может быть уменьшена за счет его модернизации. Влияние состава подвижной фазы на неопределенность факторов удерживания в ВЭЖХ связано с экспоненциальной зависимостью фактора удерживания от объемной доли органического растворителя [234]. Кроме того, установлено, что при использовании одной и той же подвижной фазы относительное стандартное отклонение фактора удерживания несколько снижается для более удерживаемых компонентов [235].

Неопределенность площади хроматографического пика связана как с упомянутыми выше неопределенностями состава подвижной фазы и температуры, так и со специфическими параметрами, такими как шум детектора вследствие изменений в скорости подвижной фазы. Неопределенность площади пика обратно пропорциональна отношению сигнал-шум. Особенно важным в случае расчета площади хроматографического пика является процесс интегрирования, например, выбор начальной и конечной точек для интегрирования хроматографического пика [236]. Необходимо отметить, что для ВЭЖХ разделений было установлено, что относительное стандартное отклонение площади пика значительно уменьшается с увеличением удерживания [233]. Кроме того, неопределенность площади пика связана со сходимостью в работе автосамплера и неправильно установленным объемом петли для ввода пробы.

К сожалению, как указывалось выше, работы по исследованию источников неопределенности в ВЭЖХ появляются достаточно редко, а в МЖХ, насколько нам известно, до наших исследований таких работ проведено не было.

При наличии нескольких способов оценки неопределенности возникает закономерный вопрос о том, насколько согласуются оценки неопределенности, полученные на основании разных подходов. Сопоставление результатов оценивания неопределенности было проведено в работе [237] на данных по определению макролидных антибиотиков в лекарственном препарате для ветеринарии. Необходимо отметить, что авторы не учитывали неопределенность отбора пробы в своих исследованиях [237]. Показано, что четыре сопоставленных в работе подхода (восходящий, нисходящий, подход Барвика и Эллисона [238-244] и подход, основанный на использовании только характеристик робастности) дают близкие оценки неопределенности, составляющие 2-4 %. Однако авторы указывают на необходимость тщательного выбора и исследования источников неопределенности при использовании восходящего подхода, так как многие из выявленных источников неопределенности могут не быть независимыми.

Одним из подходов к более тщательному исследованию источников неопределенности хроматографического анализа, может, как нам кажется, стать разделение источников неопределенности на группы и исследование вклада каждой группы в неопределенность конечного результата с последующим более подробным

анализом источников неопределенности в группах, дающих наибольший вклад в неопределенность конечного результата.

3. Неопределенность факторов удерживания в МЖХ

Факторы, влияющие на неопределенность факторов удерживания и площадей хроматографических пиков в МЖХ, изучены нами на экспериментальных данных по разделению 4 эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты (парабенов) и 7 полиароматических углеводородов, оценивая прецизионность в условиях сходимости и промежуточную прецизионность. Выбор смесей веществ для разделения обусловлен их распространенностью в различных практически важных объектах анализа. К тому же в смеси парабенов удобно проследить закономерности, характерные для гомологического ряда, а ПАУ являются примером смеси «конгенериков», т.е. веществ с близкой структурой и свойствами. Для разделения парабенов использовали мицеллярный элюент с молярной концентрацией ДСН 0.097 М и объемной долей 1-бутанола 3 %, а при разделении ПАУ — с молярной концентрацией ДСН 0.100 М и объемной долей 1-бутанола 15 %. Более подробное описание эксперимента по изучению неопределенности факторов удерживания и площадей хроматографических пиков в зависимости от состава мицеллярного элюента приведено в Приложении А.

3.1 Модели удерживания в ВЭЖХ и МЖХ

Неопределенность фактора удерживания (k) является не только обязательной валидационной характеристикой, но и необходима при моделировании хроматографического удерживания и построении зависимостей удерживание-свойство или удерживание-структура на основе аддитивных схем, связывающих $\log k$ и набор дескрипторов [245]. Практический интерес представляют модели, в которых значения $\log k$ связывают с гидрофобностью веществ или биологической активностью [59, 163, 172, 246-252].

Известные описания влияния состава элюента на фактор удерживания в ВЭЖХ базируются на различных исходных моделях хроматографического процесса. В ОФ-ВЭЖХ итоговые уравнения представляют собой линейные зависимости разных функций фактора удерживания от функций объемной доли (φ) или концентрации (C) органического растворителя, а именно: а) зависимость $\ln k$ от φ и φ^2 (Яндера, [245, 253-255]); б) зависимость $\log k$ от $\log C$ (Мураками, [256]), в) зависимость $1/k$ от φ и $\ln \varphi$ [234]. В нормально-фазовой ВЭЖХ используются зависимости разных функций фактора удерживания от содержания более полярного компонента (B) бинарного элюента: а) зависимость $\log k$ от $\log N_B$, где N_B — мольная доля компонента B (уравнение Снайдера-Сочевиньского [257, 258]), б) зависимость $1/k$ от концентрации компонента B (уравнение Скотта-Кучеры [245]).

В МЖХ наиболее известной содержательной моделью является трехфазная модель Армстронга-Нома, из которой следует зависимость величины $1/k$ от

концентрации поверхностно-активного вещества (ПАВ) в мицеллярном элюенте [44], а для гибридных мицеллярных элюентов – от концентрации ПАВ и объемной доли φ растворителя-модификатора [23, 26]. Недавно предложена содержательная модель удерживания в МЖХ на основе квазихимической концепции мицеллообразования (модель изменения микроокружения сорбата [16, 18, 23, 25, 26]), из которой следует линейная зависимость $\log k$ от $\log c_R$ и $\log c_S$ (c_R – концентрация растворителя-модификатора, c_S – концентрация ПАВ в гибридном мицеллярном элюенте). Наряду с этим в качестве описывающих функций в МЖХ используются эмпирические уравнения, отражающие полиномиальные зависимости $1/k$ или $\log k$ от концентрации ПАВ и объемной доли φ растворителя-модификатора [26].

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

3.2 Общие сведения о дисперсионном анализе и выявление выбросов в первичных экспериментальных данных

Обычно анализ данных принято начинать с выявления и исключения аномальных наблюдений (резко выделяющихся результатов, выбросов, грубых промахов), поскольку даже единственный выброс может привести к грубым ошибкам при проверке статистических гипотез [259] и смещению оценок выборочных параметров [260, 261]. Критерии для исключения резко выделяющихся наблюдений приведены в таблицах по математической статистике [262, 263] и специальной химической литературе, посвященной обработке и представлению результатов химического анализа [264, 265]. Эти критерии основаны на предположении о нормальном распределении генеральной совокупности, из которой получены выборки, и их применение полностью корректно только при выполнении этого условия. К робастным, т.е. устойчивым к нарушению основных предположений, методам проверки относится MAD-тест (median absolute deviation) [266, 267].

В предварительном анализе полученных нами экспериментальных данных были использованы как разные параметрические критерии, так и непараметрический тест. Однако при этом получались противоречивые выводы о наличии выбросов; на такую возможность указывается и в работах [266, 267]. Для дальнейшего анализа использовался весь массив экспериментальных данных. От исключения подозрительных результатов отказались, поскольку не было оснований предполагать, что они получены: (1) при неправильной записи результатов человеком или прибором, (2) при нарушении условий проведения эксперимента [266].

Характеристики неопределенности фактора удерживания изучали с помощью дисперсионного анализа на основе модели:

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

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

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

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

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

Применяя параметрический F -критерий и критерий Бартлетта для сопоставления дисперсий, учитывали, что F -критерий чувствителен к появлению больших отклонений, обусловленных более длинными «хвостами» распределения изучаемой величины, а критерий Бартлетта может с большей вероятностью отвергнуть гипотезу о равенстве дисперсий, если часть совокупности, из которой получены выборки, имеет распределение, отличающееся от нормального [259, 263].

3.3 Повторяемость и промежуточная прецизионность факторов удерживания эфиров 4-гидроксибензойной кислоты

При разделении эфиров ГБК было получено 5 серий измерений; серии 1-3 выполнены в один день, серия 4 во второй день, серия 5 в третий. Серией считали совокупность результатов, полученных с использованием отдельных порций однажды приготовленного раствора элюента. При переходе к новой серии измерений повторяли приготовление раствора элюента. План эксперимента представлен на рис. 2.

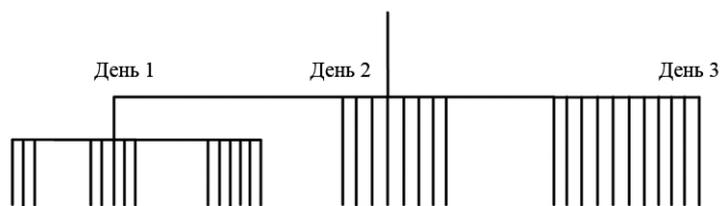


Рисунок 2. План эксперимента по изучению повторяемости и промежуточной прецизионности факторов удерживания парабенов

Анализ данных по критериям Фишера и Бартлетта показал, что дисперсии повторяемости фактора удерживания для серий, полученных в течение дня, не отличаются при 5 % уровне значимости (табл. 1). При равенстве дисперсий внутри

серий дисперсия между сериями в течение одного дня незначимо отличается от внутрисерийной (табл. 2), на этом основании была рассчитана объединенная дисперсия серий 1-3.

Таблица 1. Сопоставление внутрисерийных дисперсий фактора удерживания при разделении парабиенов

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

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

Таблица 2. Дисперсионный анализ повторяемости фактора удерживания при разделении эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты

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

Дисперсии фактора удерживания, полученные в течение трех дней, не отличались при 1 % уровне значимости для всех парабиенов и при 5 % уровне значимости для этилового, пропилового и бутилового эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты (табл. 3).

При изучении промежуточной прецизионности фактора удерживания оказалось, что дисперсия между днями значимо отличается от дисперсии внутри дней, что свидетельствует о наличии влияющего фактора, меняющегося во времени (табл. 4).

Таблица 3. Сопоставление внутридневных дисперсий фактора удерживания при разделении парабенов

	i	j	Критерий Бартлетта, χ^2 ($\chi^2_{\text{теор.}}=5.99$)	f_i	f_j	$F_{\text{эксп.}}$	$F_{\text{табл., 0.05}}$
Ме-парабен	4	5	7.64	10	7	16.96	4.57
	1	4		7	12	4.69	1.38
	1	5		10	12	9.20	6.31
Ет-парабен	4	5	1.62	10	7	15.00	2.15
	1	4		7	12	4.44	1.46
	1	5		10	12	8.66	3.09
Рг-парабен	4	5	1.51	10	7	14.00	1.09
	1	4		10	12	4.62	1.76
	1	5		10	12	8.06	1.92
Ви-парабен	5	4	0.12	7	10	11.85	1.28
	1	4		7	12	5.33	1.19
	5	1		12	10	7.68	1.08

Таблица 4. Дисперсионный анализ промежуточной повторяемости фактора удерживания при разделении парабенов

	Ме-парабен	Ет-парабен	Рг-парабен	Ви-парабен
Дисперсия внутри дней	0.022	0.021	0.017	0.007
Дисперсия между днями	2.00	1.69	1.27	0.53
F-критерий ($F_{\text{табл.}}=3.32$)	91	80	76	72
s^2_T	0.18	0.16	0.12	0.05

На рис. 3 и 4 представлены зависимости повторяемости, выраженной как стандартное отклонение фактора удерживания, и относительное стандартное отклонение фактора удерживания от среднего значения фактора удерживания между днями.

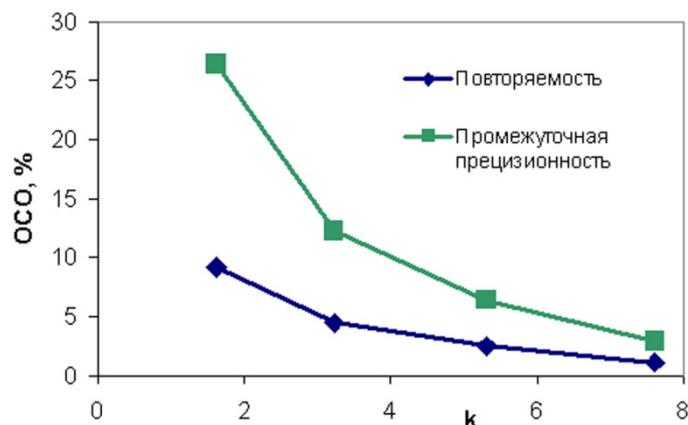


Рисунок 3. Зависимость относительного стандартного отклонения повторяемости и промежуточной прецизионности фактора удерживания от среднего значения фактора удерживания парабенов.

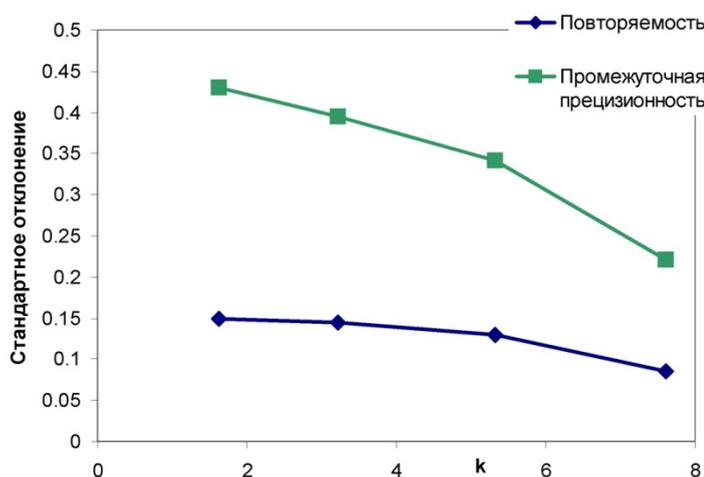


Рисунок 4. Зависимость стандартного отклонения повторяемости и промежуточной прецизионности фактора удерживания от среднего значения фактора удерживания парабенов.

Очевидно, что значение относительного стандартного отклонения факторов удерживания в условиях повторяемости и в условиях промежуточной прецизионности уменьшаются с увеличением значения фактора удерживания. При этом для метилового эфира 4-гидроксibenзойной кислоты наблюдаются очень высокие значения неопределенности фактора удерживания, что, скорее всего, связано с малыми по абсолютной величине значениями фактора удерживания и погрешностями в его интегрировании.

3.4 Повторяемость и промежуточная прецизионность факторов удерживания полиароматических углеводов

При разделении ПАУ было получено 3 серии измерений, серия 1 в первый день, серии 2 и 3 во второй день (Рис. 5).



Рисунок 5. План эксперимента по изучению повторяемости и промежуточной прецизионности факторов удерживания ПАУ

Оказалось, что в пределах серии разброс значений времен удерживания для ряда ПАУ и мертвого времени в сериях 1 и 3 не превышает минимального различия, регистрируемого прибором, которое равно 0.008. Обычный способ расчета дисперсии внутри серии приводил к заниженным оценкам. Поэтому использовали правило

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

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

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

Таблица 5. Значения внутрисерийной дисперсии фактора удерживания при разделении ПАУ

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

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

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

При анализе смеси ПАУ не удается получить более двух серий измерений в течение одного дня, поскольку время удерживания последнего компонента составляет около 30 минут. Поэтому провести достаточно строгое исследование влияние межсерийного и междневного факторов не представляется возможным. Во всяком случае, очевидно, что дисперсии фактора удерживания ПАУ существенно ниже, чем в случае парабенов. По-видимому, это связано со спецификой используемой подвижной фазы, поскольку лучшая сходимость при анализе ПАУ (по сравнению с парабенами) наблюдается не только для времен удерживания разделяемых компонентов, но и для мертвого времени удерживания, определяемого по одному и тому же компоненту – 4-гидроксibenзойной кислоте.

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

Таблица 7. Дисперсионный анализ результатов хроматографирования ПАУ

	Бензол	Нафталин	Аценафтен	Фенантрен	Флуорантен	Хризен	Бенз(а)пирен
Дисперсия внутри серий 2-3	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$2.6 \cdot 10^{-4}$	$4.2 \cdot 10^{-3}$	$5.1 \cdot 10^{-4}$	$6.3 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$
Дисперсия между сериями 2-3	$2.0 \cdot 10^{-3}$	$7.9 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$1.8 \cdot 10^{-2}$	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$4.1 \cdot 10^{-2}$	$6.0 \cdot 10^{-2}$
F -критерий	23	59	69	65	70	76	81

$(F_{\text{табл. } 0.05}=5.59)$							
<i>Дисперсия, обусловленная межсерийным фактором</i>	$4.4 \cdot 10^{-4}$	$1.7 \cdot 10^{-3}$	$3.3 \cdot 10^{-3}$	$4.0 \cdot 10^{-3}$	$5.1 \cdot 10^{-3}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$	$1.3 \cdot 10^{-2}$

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

При разделении ПАУ значения стандартного отклонения между сериями увеличиваются с ростом значений фактора удерживания (рис. 6), что можно объяснить уширением пиков и, следовательно, увеличением неопределенности при локализации максимума для наиболее удерживаемых компонентов. При этом значения относительного стандартного отклонения факторов удерживания составляют менее 1% (рис. 7). Необходимо, однако, отметить, что фактор удерживания бензола соответствует приблизительно фактору удерживания пропилового эфира 4-гидроксibenзойной кислоты, для которого значения неопределенности уже гораздо ниже, чем для метилового и этилового эфира, хотя и практически в 10 раз выше, чем для бензола. Следовательно, нельзя сделать однозначного вывода о связи неопределенности со значением фактора удерживания. Возможно также, что значение неопределенности зависит от состава подвижной фазы и состояния неподвижной фазы, о чем говорилось выше, а также от природы разделяемых аналитов.

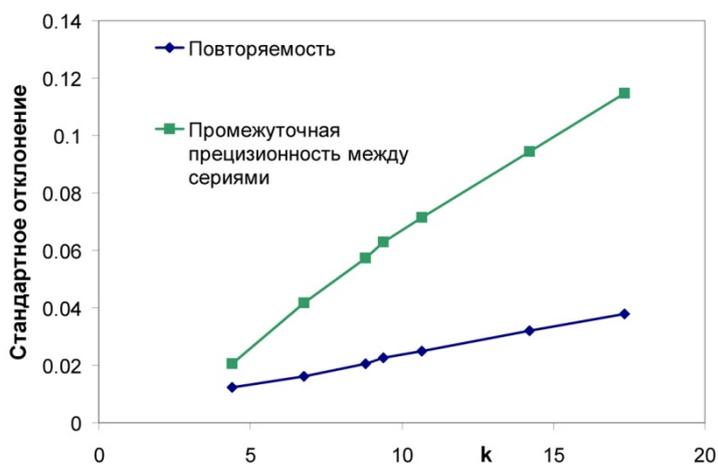


Рисунок 6. Зависимость стандартного отклонения повторяемости фактора удерживания и промежуточной прецизионности между сериями от среднего значения фактора удерживания ПАУ.

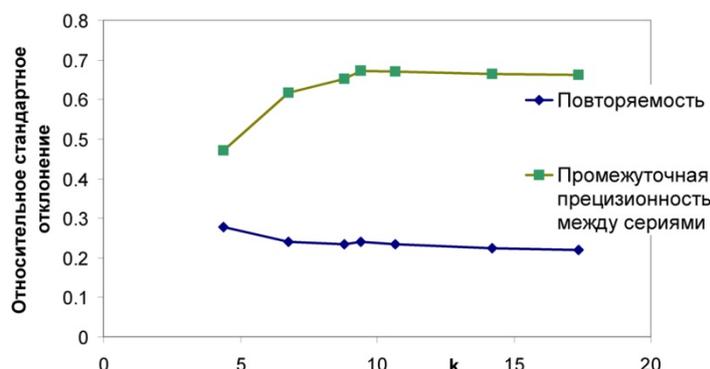


Рисунок 7. Зависимость относительного стандартного отклонения повторяемости фактора удерживания и промежуточной прецизионности между сериями от среднего значения фактора удерживания ПАУ.

3.5 Зависимость неопределенности факторов удерживания парабиенов от состава подвижной фазы

Для исследования влияния состава мицеллярной подвижной фазы на неопределенность факторов удерживания были использованы данные по разделению парабиенов с подвижными фазами различного состава. В табл. 8 приведены составы подвижных фаз. Подвижные фазы применяли для разделения смеси парабиенов в случайном порядке. Как и следовало ожидать, факторы удерживания парабиенов значительно уменьшались как при увеличении концентрации ДСН в подвижной фазе, так и при увеличении содержания органического модификатора 1-бутанола.

Таблица 8. Состав подвижных фаз и порядок их использования

Номер мицеллярной подвижной фазы	Концентрация ДСН, М	Содержание 1-БуОН, % (по объему)	Порядок использования подвижных фаз
1	0.05	0.5	5
2	0.15	0.5	3
3	0.25	0.5	2
4	0.05	3.75	4
5	0.15	3.75	7
6	0.25	3.75	8
7	0.05	7	1
8	0.15	7	9
9	0.25	7	6

Оказалось, что внутрисерийное стандартное отклонение фактора удерживания каждого парабена увеличивается практически линейно с увеличением значения его фактора удерживания, то есть с уменьшением элюирующей силы подвижной фазы. Лишь для бутилового эфира 4-гидроксibenзойной кислоты оно оставалось практически постоянным. В то же время относительное стандартное отклонение фактора удерживания оставалось практически неизменным при варьировании состава подвижной фазы и уменьшалось в ряду метиловый>этиловый>пропиловый>бутиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты аналогично результатам, представленным выше для подвижной фазы постоянного состава.

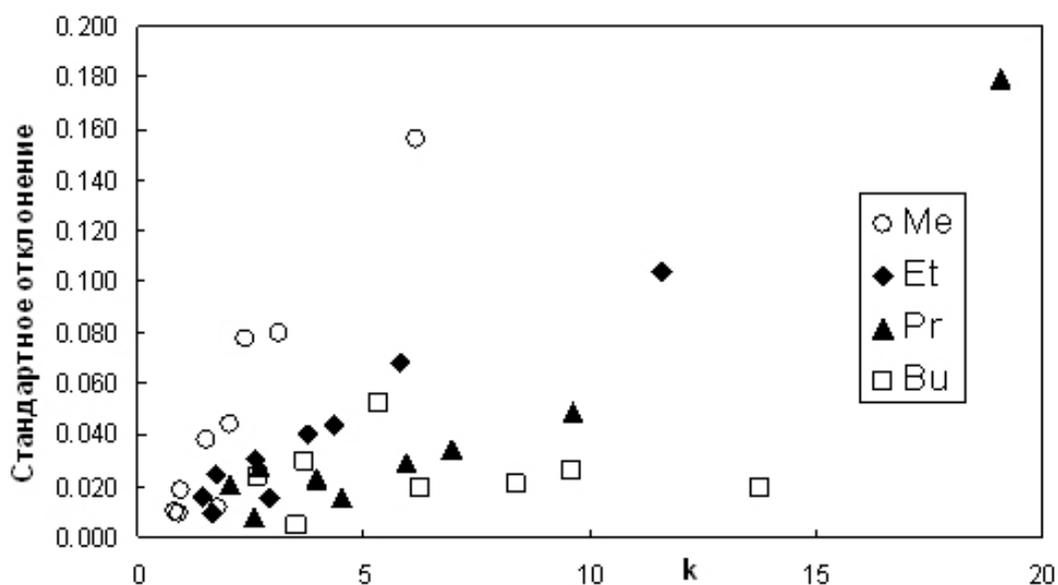


Рисунок 8. Зависимость внутрисерийного стандартного отклонения фактора удерживания от абсолютного значения фактора удерживания.

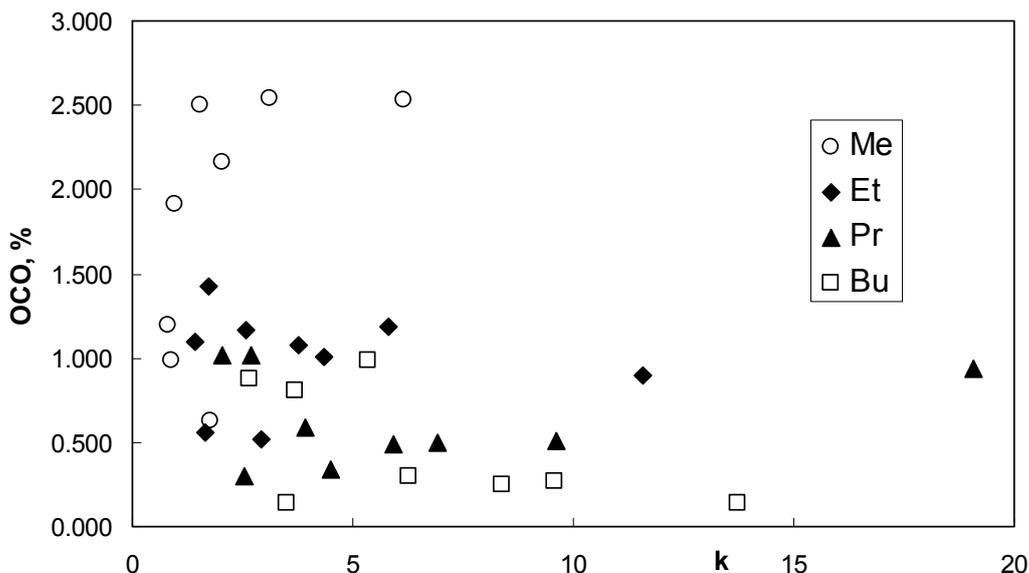


Рисунок 9. Зависимость внутрисерийного относительного стандартного отклонения фактора удерживания от абсолютного значения фактора удерживания.

Возрастание дисперсии фактора удерживания при значительном уменьшении элюирующей силы объясняется увеличением неопределенности локализации максимума пика вследствие его размывания при увеличении времени удерживания. Интересно, что зависимости стандартного отклонения от значения фактора удерживания имеют различный наклон, который нельзя предсказать заранее. Поэтому при формулировке определенных требований к неопределенности фактора удерживания необходимо проводить предварительные экспериментальные исследования прецизионности. Это особенно важно при построении зависимостей удерживание-структура и удерживание-гидрофобность, где значения факторов удерживания применяются для предсказания нехроматографических свойств аналитов.

Сопоставляя результаты, полученные нами для МЖХ, с литературными данными, известными для ВЭЖХ, можно утверждать, что в МЖХ можно добиться неопределенности факторов удерживания, соответствующей лучшим примерам в ОФ-ВЭЖХ [233].

3.6 Моделирование в мицеллярной жидкостной хроматографии с использованием данных о гетероскедастичности фактора удерживания

Для моделирования процессов с использованием алгебраических выражений чаще всего используют обычный метод наименьших квадратов (МНК). Применение МНК базируется на следующих допущениях: (i) неопределенность зависимой переменной гораздо выше неопределенности независимой переменной; (ii) неопределенность зависимой переменной изменяется случайно; (iii) случайные отклонения зависимой переменной распределены нормально; (iv) дисперсия зависимой переменной одинакова для всех значений зависимой переменной (гомоскедастичность). Как было

показано выше, дисперсия фактора удерживания зависит от природы разделяемых соединений и значения фактора удерживания (состава подвижной фазы). Поэтому необходимо изучить влияние гетероскедастичности фактора удерживания на результаты моделирования в МЖХ.

3.6.1 Моделирование удерживания

Известно несколько попыток устранить влияние эффектов, связанных с линеаризацией функции фактора удерживания, используя статистические веса в расчетах [268, 269], но при этом авторы принимали во внимание только эффект линеаризации, считая постоянной дисперсию фактора удерживания.

Для оценки влияния гетероскедастичности на качество моделирования нами было проведено моделирование удерживания парабенов с использованием известных эмпирических уравнений и с использованием предложенного нами уравнения (3) [16, 23, 25, 26] с применением взвешенного и обычного МНК:

$$\log k = a + b \log c_s + c \log \varphi, \quad (3)$$

$$1/k = a + bc_s + c\varphi + dc_s\varphi + ec_s\varphi^{0.5}, \quad (4)$$

$$1/k = a + bc_s + c\varphi, \quad (5)$$

$$1/k = a + bc_s + c\varphi + dc_s\varphi + ec_s\varphi^2, \quad (6)$$

$$1/k = a + bc_s + c\varphi + dc_s\varphi + ec_s^2 + f\varphi^2, \quad (7)$$

$$\lg k = a + bc_s + c\varphi, \quad (8)$$

где c_s – концентрация ПАВ;
 φ – объемная доля модификатора.

3.6.2 Расчет статистических весов

Статистические веса рассчитывали на основе следующего соотношения:

$$s_f^2 \cong \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f(x_i)}{\partial x_i} \right)^2 s_{x_i}^2, \quad (9)$$

где s_f^2 – дисперсия конечной трансформированной функции;
 $s_{x_i}^2$ – дисперсия исходной функции.

Уравнения для расчета статистических весов логарифмической и гиперболической функции фактора удерживания имели следующий вид:

$$w_{1/k} = k^4 / s_k^2 \quad (10)$$

$$w_{\lg k} = k^2 / 0.434 s_k^2 \quad (11)$$

где s_k^2 рассчитывали как произведение фактора удерживания на тангенс угла наклона прямой, которая аппроксимирует зависимость дисперсии k от значения k в условиях варьирования состава подвижной фазы (для метилового, этилового и пропилового эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты). Для бутилового эфира использовали постоянное значение дисперсии для всех подвижных фаз, за исключением наибольшего значения фактора удерживания, для которого использовали экспериментально определенное значение дисперсии.

3.6.3 Оценка качества описания и предсказательной способности моделей удерживания

Обычно качество описания для разных моделей, т.е. насколько хорошо уравнение описывает экспериментальные данные, характеризуют при помощи множественного коэффициента корреляции R [270-274]:

$$R^2 = \frac{\sum (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2}{\sum (Y_i - \bar{Y})^2} \quad (12)$$

где \hat{Y}_i – предсказанное значение моделируемой характеристики удерживания;

\bar{Y} – среднее значение характеристики;

Y_i – экспериментальное значение характеристики.

Однако использование R или R^2 для сопоставления моделей удерживания может потерять смысл, поскольку R является положительно смещенной оценкой коэффициента корреляции генеральной совокупности [274]. Кроме того, если набор данных не очень большой, а количество параметров в уравнении достаточно большое, то уравнение, которое хорошо описывает небольшой набор данных, может плохо прогнозировать результаты удерживания при увеличении числа экспериментальных точек [270, 271]. При моделировании удерживания в МЖХ желательно оптимизировать разделение, используя наименьшее число экспериментальных точек. Однако, когда описание ограниченного объема экспериментальных данных улучшают за счет увеличения количества параметров модели, а качество описания оценивают по значению R , то, как показывает практика, можно прийти к неверным заключениям об адекватности модели, так как R всегда уменьшается при увеличении числа степеней свободы [275, 276].

Для адекватного сопоставления моделей с разным числом параметров больше подходит приведенный коэффициент корреляции R_{adj} [272, 273]. Это несмещенная оценка коэффициента корреляции генеральной совокупности, которая учитывает число степеней свободы и может быть рассчитана по следующему уравнению:

$$R_{adj}^2 = 1 - (1 - R^2) \left[\frac{N - 1}{N - p} \right] \quad (13)$$

где N – число экспериментальных точек;
 p – число параметров в уравнении регрессии.

Другая важная характеристика модели – прогностическая способность, т.е. возможность предсказывать удерживание при использовании подвижных фаз другого состава, чем те, по которым построены модели. Значения R и R_{adj} не характеризуют эту способность.

Известно, что наиболее реалистическую оценку прогностической способности модели можно получить с использованием процедуры кросс-валидации [277] с использованием «leave-one-out» метода, который ранее уже успешно использовали в МЖХ [151, 152]. В ходе процедуры кросс-валидации модель строят, удаляя одну экспериментальную точку из набора данных и предсказывая ее значение на основе построенной модели. Такую процедуру повторяют для всех экспериментальных точек и рассчитывают коэффициент корреляции между предсказанными и экспериментальными значениями (R_{cross}). Чем выше полученный коэффициент корреляции, тем лучше прогностическая способность модели.

3.6.4 Сравнение моделей удерживания

Рассчитанные параметры уравнений (3)-(8), значения R , R_{adj} и R_{cross} , приведены в табл. 9 и табл. 10. Модели значительно отличаются как описывающей, так и прогностической способностью. Сравнивая значения R , можно было бы сделать вывод, что уравнения (5)-(7) лучше описывают эксперимент, чем уравнения (3), (4), (8). Однако, если принять во внимание значения R_{adj} , то становится очевидным, что трехпараметрическое уравнение (3) лучше описывает удерживание, чем уравнения (5) и (6) с пятью параметрами с использованием как обычного, так и взвешенного МНК. Кроме того, при заданном объеме эксперимента модели с пятью параметрами вообще не позволяют получить значимые коэффициенты регрессии.

При сравнении прогностической способности видно, что использование уравнений (5), (6) для всех парабенов и уравнения (7) для метилового эфира 4-гидроксibenзойной кислоты приводит к заниженным значениям R_{cross} по сравнению с величинами R , R_{adj} . Это свидетельствует о низкой прогностической способности пятипараметрических уравнений. Только для уравнения (3) наблюдаются стабильно высокие значения R_{cross} для парабенов, при использовании как обычного, так и взвешенного МНК. В отдельных случаях высокие значения R_{cross} обеспечивает также уравнение (7) (данные для пропилового и бутилового эфира 4-гидроксibenзойной кислоты).

Сопоставляя значения критериев R , R_{adj} и R_{cross} , полученные с использованием взвешенного и обычного МНК, можно заметить, что игнорирование гетероскедастичностью фактора удерживания в ряде случаев может приводить к слишком оптимистическим оценкам качества моделирования. Вместе с этим обращает на себя внимание тот факт, что использование трехпараметрического уравнения (3)

обеспечивает близкое качество моделирования с использованием как взвешенного, так и обычного МНК.

Таким образом, билогарифмическое трехпараметрическое уравнение (3) продемонстрировало более высокое качество описания экспериментальных данных по разделению парабенов, чем другие протестированные уравнения даже с большим количеством параметров. Прогностическая способность этой модели превышает таковую для уравнений с таким же и большим числом параметров.

3.6.5 Построение зависимостей удерживание-гидрофобность с учетом неопределенности фактора удерживания

В соответствии с определением IUPAC [209], гидрофобность – это ассоциация неполярных групп или молекул в водном окружении, которая обусловлена тенденцией воды выталкивать неполярные молекулы. Наиболее распространенным параметром гидрофобности является логарифм константы распределения вещества в системе 1-октанол-вода. Эти величины представляют интерес для прогнозирования токсичности и поведения веществ в биологических системах.

Таблица 9. Параметры уравнений (3), (4), (8), полученные с использованием обычного и взвешенного МНК (результаты, полученные обычным МНК, приведены в скобках)

$1/k = a + bc_s + c\varphi$						
	A	b	c	R	R_{cross}	R_{adj}
MP	0.0051 (-0.084)	2.68 (3.15)	0.047 (0.070)	0.89 (0.94)	0.84 (0.87)	0.85 (0.87)
EP	-0.010 (-0.072)	1.67 (1.94)	0.026 (0.042)	0.92 (0.96)	0.89 (0.90)	0.89 (0.91)
PP	-0.011 (-0.065)	1.11 (1.34)	0.016 (0.029)	0.90 (0.97)	0.90 (0.91)	0.86 (0.93)
BP	-0.0083 (-0.053)	0.77 (1.01)	0.011 (0.011)	0.93 (0.97)	0.91 (0.90)	0.91 (0.93)
Относительное стандартное отклонение, %	68	12	14			
$\log k = a + bc_s + c\varphi$						
	a	b	c	R	R_{cross}	R_{adj}
MP	0.91 (0.83)	-2.79 (-2.50)	-0.06 (-0.05)	0.93 (0.95)	0.89 (0.90)	0.91 (0.93)
EP	1.20(1.12)	-3.05 (-2.71)	-0.06 (-0.06)	0.95 (0.96)	0.90 (0.90)	0.93 (0.95)
PP	1.43 (1.35)	-2.85 (-2.89)	-0.06 (-0.06)	0.96 (0.96)	0.92 (0.90)	0.95 (0.95)
BP	1.64(1.52)	-2.87 (-2.99)	-0.04 (-0.06)	0.96 (0.96)	0.94 (0.92)	0.95 (0.95)
Относительное стандартное отклонение, %	5	13	18			
$\log k = a + b \log c_s + c \log c_R$						
	a	b	c	R	R_{cross}	R_{adj}
MP	-0.63 (-0.59)	-0.77 (-0.73)	-0.31 (-0.29)	0.98 (0.98)	0.97 (0.97)	0.97 (0.97)
EP	-0.45 (-0.40)	-0.83 (-0.79)	-0.32 (-0.30)	0.99 (0.99)	0.98 (0.97)	0.99 (0.99)
PP	-0.30 (-0.25)	-0.94 (-0.87)	-0.33 (-0.31)	0.991 (0.992)	0.98 (0.98)	0.99 (0.99)
BP	-0.25 (-0.15)	-0.94 (-0.87)	-0.36 (-0.33)	0.990 (0.992)	0.97 (0.98)	0.99 (0.99)
Относительное стандартное отклонение, %	18	6	9			

Таблица 10. Параметры уравнений (5)-(7), полученные при использовании обычного и взвешенного МНК (результаты, полученные обычным МНК, приведены в скобках, жирным выделены параметры, которые значимо отличаются от нуля при 5 % уровне значимости)

$1/k = a + bc_s + c\varphi + dc_s\varphi + ec_s\varphi^{0.5}$									
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>R</i>	<i>R_{cross}</i>	<i>R_{adj}</i>	
MP	0.034 (0.048)	1.24 (0.72)	0.027 (0.036)	-0.24 (-0.50)	1.71 (2.45)	0.96 (0.97)	0.59 (0.87)	0.92 (0.94)	
EP	0.0077 (0.020)	0.98 (0.84)	0.014 (0.017)	-0.022 (-0.055)	0.68 (0.74)	0.98 (0.99)	0.77 (0.91)	0.96 (0.98)	
PP	0.0013 (0.011)	0.72 (0.62)	0.0073 (0.0085)	0.054 (0.036)	0.30 (0.33)	0.99 (0.992)	0.78 (0.96)	0.98 (0.98)	
BP	-0.0016 (0.0075)	0.57 (0.50)	0.0048 (0.0053)	0.071 (0.074)	0.15 (0.13)	0.992 (0.995)	0.80 (0.97)	0.98 (0.99)	
$1/k = a + bc_s + c\varphi + dc_s\varphi + ec_s\varphi^2$									
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>R</i>	<i>R_{cross}</i>	<i>R_{adj}</i>	
MP	0.034 (0.048)	2.05 (1.88)	0.027 (0.036)	0.58 (0.68)	-0.042 (-0.06)	0.96 (0.97)	0.72 (0.88)	0.92 (0.93)	
EP	0.0077 (0.020)	1.30 (1.19)	0.014 (0.017)	0.31 (0.30)	-0.017 (-0.018)	0.98 (0.99)	0.84 (0.91)	0.96(0.97)	
PP	0.0013 (0.012)	0.86 (0.78)	0.0073 (0.0085)	0.20 (0.20)	0.0073 (-0.0082)	0.99 (0.992)	0.83 (0.96)	0.98 (0.98)	
BP	-0.0016 (0.0075)	0.64 (0.56)	0.0048 (0.0053)	0.14 (0.14)	-0.0038 (-0.003)	0.992 (0.995)	0.73 (0.97)	0.98 (0.99)	
$1/k = a + bc_s + c\varphi + dc_s\varphi + ec_s^2 + f\varphi^2$									
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>C</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>R</i>	<i>R_{cross}</i>	<i>R_{adj}</i>
MP	-0.10 (-0.17)	5.16 (5.67)	0.042 (0.08)	0.28 (0.23)	-10.82 (-11.22)	$-2.1 \cdot 10^{-3}$ ($-6.3 \cdot 10^{-3}$)	0.97 (0.97)	0.93 (0.89)	0.92 (0.92)
EP	-0.046 (-0.08)	2.56 (2.92)	0.021 (0.032)	0.19 (0.16)	-4.53 (-5.34)	$-1.1 \cdot 10^{-3}$ ($-2.0 \cdot 10^{-3}$)	0.99 (0.991)	0.97 (0.94)	0.97 (0.97)
PP	-0.031 (-0.042)	1.63 (1.73)	0.010 (0.015)	0.15 (0.13)	-2.83 (-2.98)	$-4.7 \cdot 10^{-4}$ ($-9.0 \cdot 10^{-4}$)	0.996 (0.997)	0.99 (0.98)	0.992 (0.992)
BP	-0.032 (-0.027)	1.66 (1.20)	0.011 (0.0079)	0.15 (0.11)	-2.92 (-2.06)	$-5.0 \cdot 10^{-4}$ ($-3.4 \cdot 10^{-4}$)	0.998 (0.997)	0.995 (0.99)	0.995 (0.992)

Однако стандартная процедура определения коэффициента распределения в системе 1-октанол-вода с использованием «*shake flask*» метода очень трудоемкая и требует значительных количеств чистых веществ [172, 250]. Поэтому известно много попыток применить методы разделения, такие как хроматография и электрофорез, для определения коэффициентов распределения [172, 250, 278]. Это не прямые методы, которые основаны на корреляционных зависимостях. Они особенно перспективны при изучении новых соединений, когда необходимо быстро оценить их биологическую активность или биодоступность.

У МЖХ есть несколько преимуществ по сравнению с классическим вариантом ОФ-ВЭЖХ для оценки гидрофобности соединений [279, 280], а именно: (i) аналогия между строением мицелл и биомембран; (ii) стабилизация состояния стационарной фазы, свойства которой не зависят от концентрации ПАВ в мицеллярном элюенте; (iii) уменьшение влияния остаточных силанольных групп стационарной фазы.

Однако на сегодня нет общепринятого мнения о выборе зависимой переменной для построения зависимостей удерживание-гидрофобность в МЖХ (k или $\lg k$) [281]. Нелинейный характер зависимости $\lg k$ от характеристик гидрофобности веществ одного гомологического ряда в МЖХ объясняли разной локализацией веществ в мицеллах [282, 283]. Другое предложенное объяснение базируется на предположении, что корреляция между $k/\lg k$ и $\lg K_{o/w}$ в МЖХ только кажущаяся, а настоящая зависимость выражается более сложным уравнением [280]. Однако отклонения от линейности зависимости $\lg k$ от $\lg K_{o/w}$ или от числа атомов углерода в гомологе наблюдали также в ОФ-ВЭЖХ [280].

Корректировки для построения зависимостей удерживание-гидрофобность в МЖХ могут внести представления о гетероскедастичности фактора удерживания, зависимость вида скедастической кривой от природы разделяемых соединений или от состава подвижной фазы.

Нами исследовано влияние неопределенности фактора удерживания на вид зависимости $\lg k - \lg K_{o/w}$ парабеов и ПАУ. В качестве зависимой переменной использовали логарифм среднего значения фактора удерживания парабеов и ПАУ для подвижных фаз 0.097 М ДСН, 1-бутанол 3 % (по объему) и 0.100 М ДСН, 1-бутанол 15 % (по объему), соответственно. В качестве независимой переменной использовали экспериментальные литературные данные о логарифмах констант распределения в системе 1-октанол-вода и рассчитанные по программе ACD/Log P 4.03 данные для аценафтена и бенз(а)пирена. Моделирование провели с использованием обычного и взвешенного МНК. Для взвешенного МНК статистические веса рассчитывали по уравнению (11) с использованием экспериментально определенных дисперсий.

В случае ПАУ наблюдается очень высокая корреляция между $\lg k$ и $\lg K_{o/w}$, а прямые, построенные взвешенным и обычным МНК, не отличаются одна от другой (рис. 10). Корреляция между $\lg k$ и $\lg K_{o/w}$ для парабеов менее сильная (рис. 11),

особенно для взвешенного МНК. Гетероскедастичность фактора удерживания для парабенон и высокое значение дисперсии для метилового эфира 4-гидроксibenзойной кислоты выражается в игнорировании значений фактора удерживания метилового эфира при построении зависимости $\lg k - \lg K_{o/w}$ взвешенным методом МНК (рис. 11).

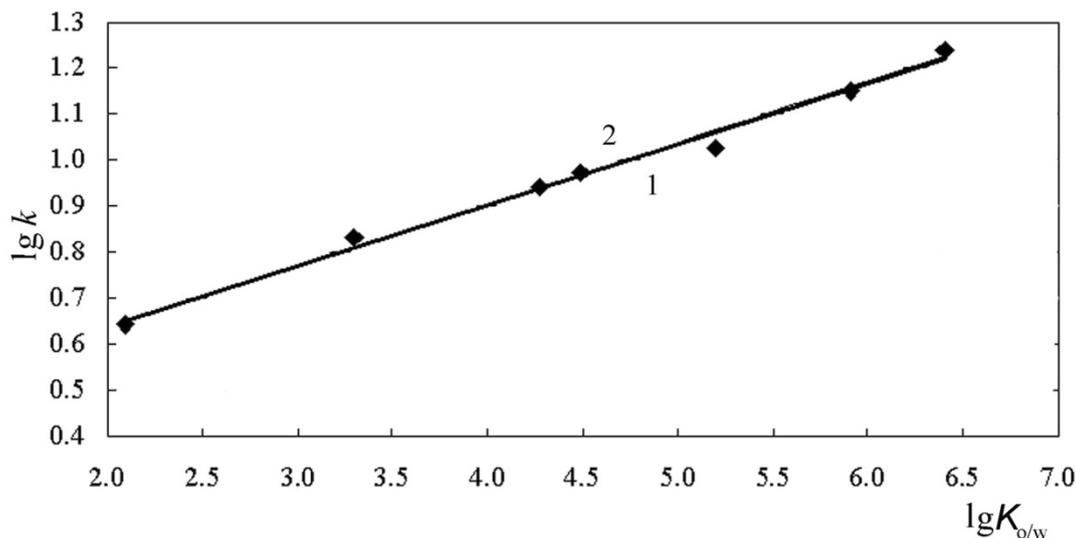


Рисунок 10. Зависимость логарифмов факторов удерживания ПАУ от логарифмов констант распределения в системе 1-октанол-вода.

Линия 1: обычный МНК, $\lg k = (0.37 \pm 0.05) + (0.13 \pm 0.01) \lg K_{o/w}$; $R = 0.996$;

линия 2: взвешенный МНК, $\lg k = (0.37 \pm 0.05) + (0.13 \pm 0.01) \lg K_{o/w}$; $R = 0.996$.

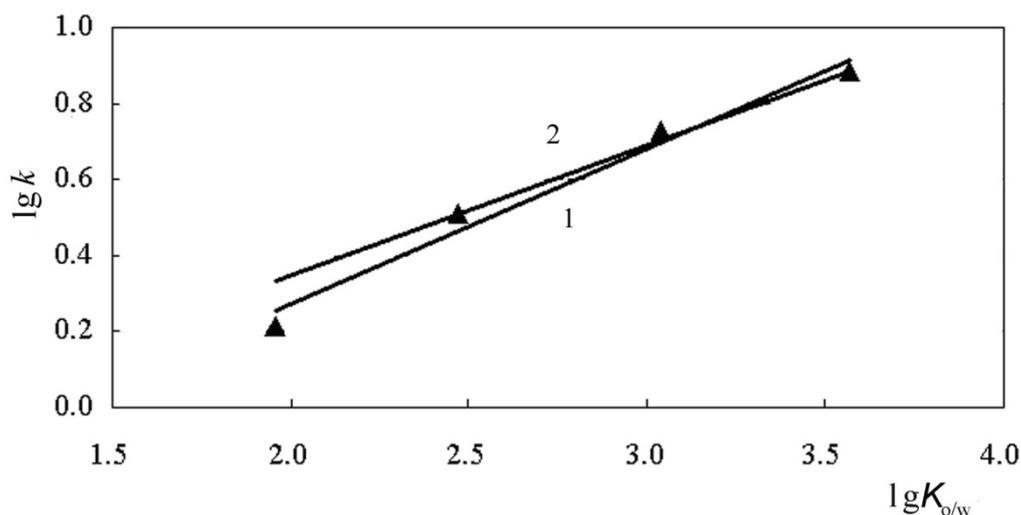


Рисунок 11. Зависимости логарифмов факторов удерживания парабенон в МЖХ от логарифмов констант распределения в системе 1-октанол-вода.

Линия 1: обычный МНК, $\lg k = (-0.55 \pm 0.30) + (0.41 \pm 0.10) \lg K_{o/w}$, $R = 0.990$;

линия 2: взвешенный МНК, $\lg k = (-0.33 \pm 0.28) + (0.34 \pm 0.08) \lg K_{o/w}$, $R = 0.97$.

Полученный результат не противоречит ранее предложенным гипотезам, которые объясняют отклонения от линейности зависимостей удерживание-гидрофобность в МЖХ. Однако очевидно, что взвешенный МНК с расчетом статистических весов с использованием экспериментальных данных о дисперсии фактора удерживания каждого вещества дает более надежную информацию о зависимости удерживание-гидрофобность и должен использоваться для построения количественных зависимостей в исследованиях удерживание-гидрофобность.

3.7 Выводы к разделу 3

Таким образом, полученные экспериментальные оценки дисперсий фактора удерживания (данные по разделению 4 парабенов и 7 полиароматических углеводородов) свидетельствуют о гетероскедастичности фактора удерживания. Зависимости стандартного отклонения в пределах одной смеси веществ имеют одинаковый вид для трех составляющих дисперсии: внутригрупповой, межгрупповой и междневной. Как следствие, характер зависимостей можно установить из ограниченного числа параллельных определений фактора удерживания. Относительное стандартное отклонения фактора удерживания уменьшается с увеличением гидрофобности в гомологическом ряду парабенов и при переходе от парабенов к группе ПАУ. Использование экспериментально определенных дисперсий фактора удерживания позволяет применить взвешенный МНК для моделирования в МЖХ, устранить влияние результатов, полученных с высокой неопределенностью, и построить надежные модели удерживание-гидрофобность. Уровень неопределенности факторов удерживания в МЖХ в общем соответствует неопределенности факторов удерживания в ОФ-ВЭЖХ.

4. Неопределенность площадей пиков

Интерес к неопределенности хроматографических характеристик, используемых для количественного определения содержания аналитов, возник сразу после появления самого хроматографического анализа. 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. В этой работе не будет затрагиваться процесс обработки сигналов в хроматографии; это отдельная область на стыке химии и прикладной математики, которой посвящены монография [3] и недавно опубликованный обзор [3, 284]

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, 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 исследования зависимости неопределенности площади пика от концентрации аналита будут рассмотрены нами в дальнейшем.

4.1 *Повторяемость и промежуточная прецизионность площадей пиков парабенов*

Как указывалось выше, 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. В наших исследованиях условиям повторяемости соответствовала серия измерений, т.е. совокупность результатов, полученных с использованием отдельных порций однажды приготовленного раствора мицеллярного элюента. Для оценки промежуточной прецизионности использовались результаты нескольких серий измерений, полученных в один и тот же день или в разные дни с повторением операции приготовления раствора элюента.

Однородность внутрисерийных дисперсий площади пиков парабенов проверяли по критериям Фишера и Бартлетта; результаты проверки представлены в таблицах 11 и 12 (на диагонали расположены значения степеней свободы для каждой серии, ниже диагоналей представлены экспериментальные значения, выше диагонали – табличные значения критерия Фишера).

Таблица 11. Значения критерия Фишера для внутрисерийных дисперсий площадей хроматографических пиков (жирным выделено число степеней свободы в каждой серии)

	Me-парабен						Et-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

	Pr-парабен						Bu-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 12. Значения критерия Бартлетта для дисперсий площадей пиков парабенов, полученных в течение одного дня и в течение трех дней.

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

На основании приведенных в таблицах 11 и 12 результатов можно сделать вывод об однородности внутрисерийных дисперсий. Однако, как видно из рис. 12, 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.

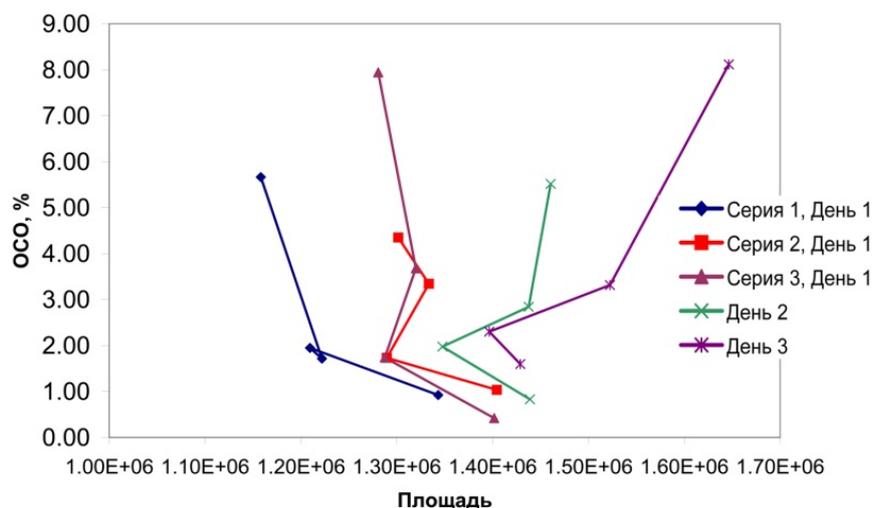


Рисунок 12. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика внутри серий от среднего значения площади пика внутри серий.

Действительно, критерий Фишера указывает на значимость межсерийного фактора для этилового, пропилового и бутилового эфиров 4-гидроксибензойной 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.

Таблица 13. Дисперсионный анализ повторяемости площадей пиков при разделении парабененов

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

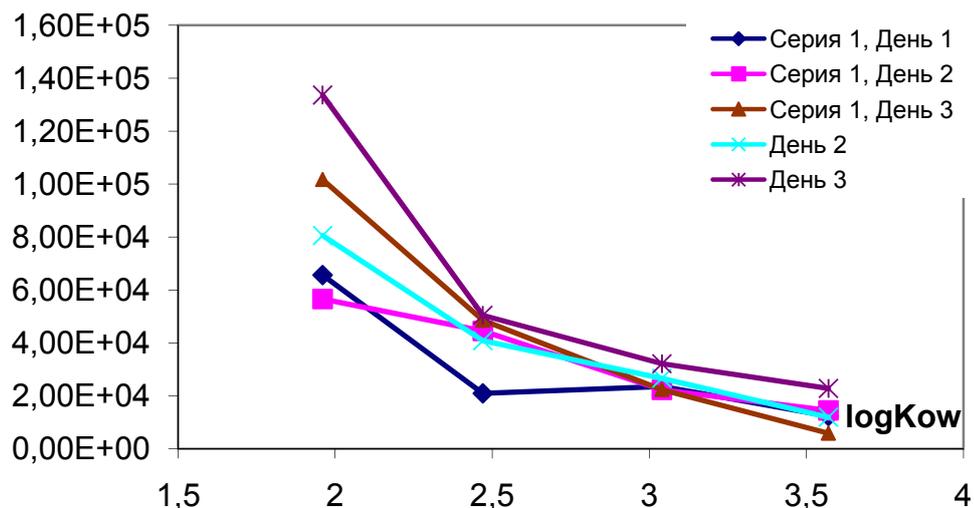


Рисунок 13. Зависимость стандартного отклонения площади пика внутри серий от гидрофобности парабена.

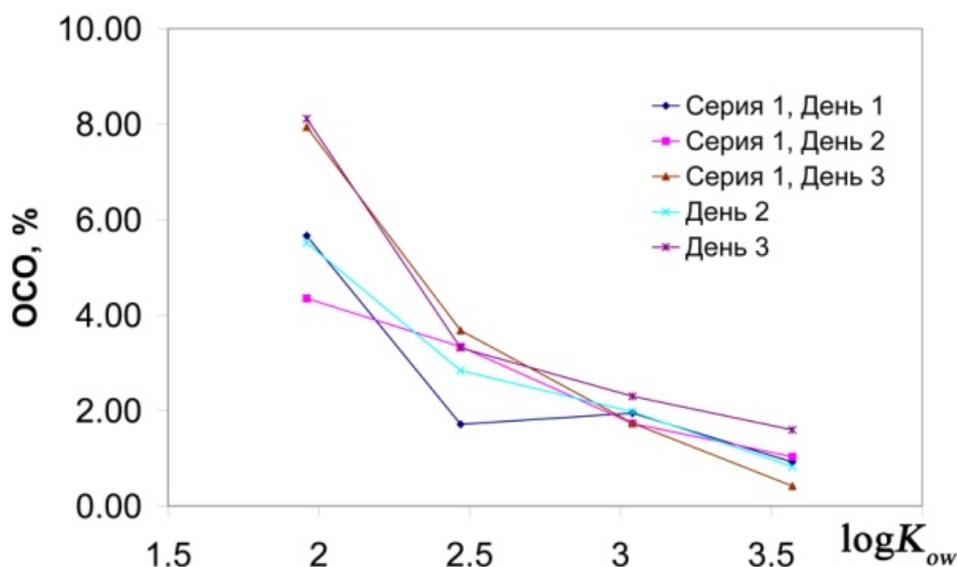


Рисунок 14. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика внутри серий от гидрофобности парабена.

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.

4.2 Повторяемость и промежуточная прецизионность площадей пиков полиароматических углеводородов

В случае ПАУ дисперсии внутри серий в соответствии с критерием Бартлетта также оказались однородными (табл. 14). 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. 15) это свидетельствует о более высокой прецизионности площадей пиков, полученных в один день для ПАУ, по сравнению с парабенами.

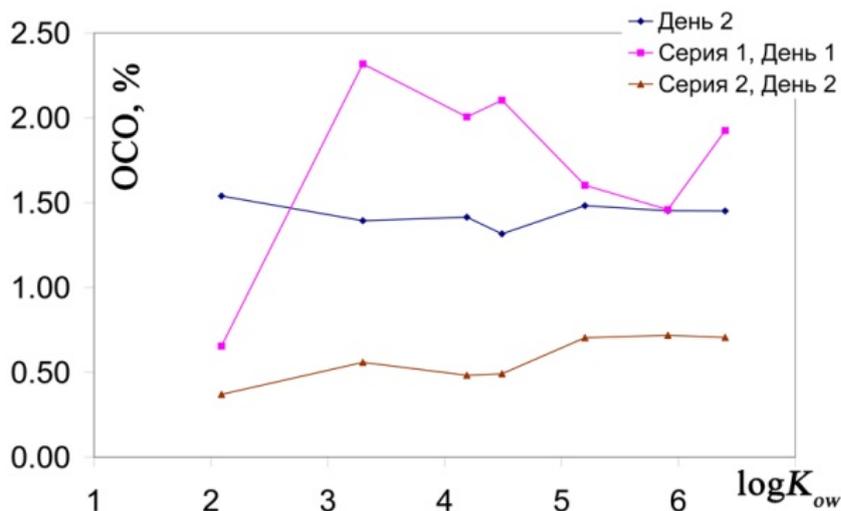


Рисунок 15. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика внутри серий от гидрофобности ПАУ.

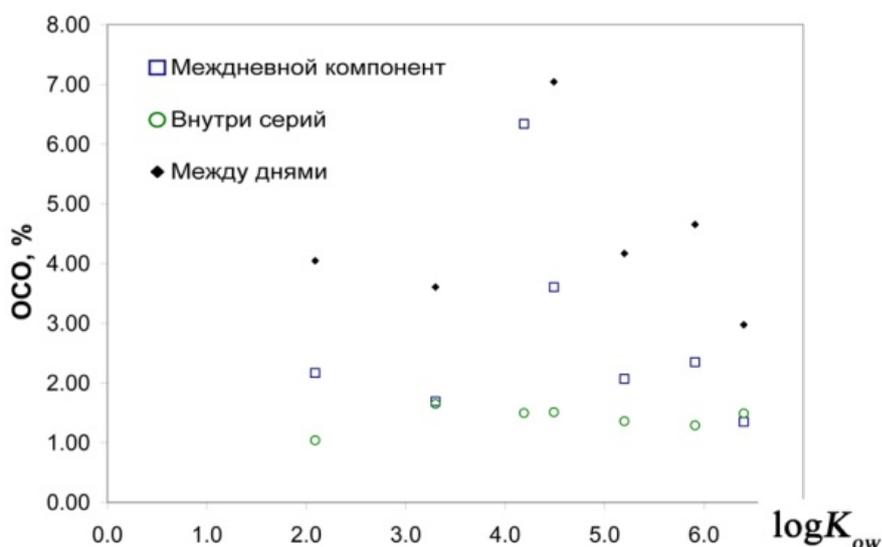


Рисунок 16. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика между днями, внутри серий и междневного компонента от гидрофобности ПАУ.

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. 14).

В общем, для ПАУ можно сделать следующие выводы: значения относительного стандартного отклонения площадей пиков ПАУ не зависят от гидрофобности и фактора удерживания, а абсолютные значения относительного стандартного отклонения площади пика для ПАУ ниже, чем для парабенов (рис. 16).

Для изучения причин более высокой прецизионности площадей пиков ПАУ по сравнению с парабенами 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 14. Дисперсионный анализ результатов измерения площадей пиков ПАУ

	Бензол	Нафталин	Аценафтен	Фенантрен	Флуорантен	Хризен	Бенз(а)пирен
Дисперсия внутри серий 2-3	$2.94 \cdot 10^8$	$3.00 \cdot 10^9$	$8.19 \cdot 10^8$	$9.66 \cdot 10^8$	$2.94 \cdot 10^9$	$3.96 \cdot 10^9$	$4.09 \cdot 10^8$
Дисперсия между сериями 2-3	$3.07 \cdot 10^{10}$	$5.68 \cdot 10^9$	$9.16 \cdot 10^8$	$3.99 \cdot 10^9$	$1.77 \cdot 10^{10}$	$2.18 \cdot 10^{10}$	$2.91 \cdot 10^9$
F-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 внутри серий 1-3	$1.04 \cdot 10^9$	$2.56 \cdot 10^9$	$7.40 \cdot 10^8$	$8.32 \cdot 10^8$	$3.23 \cdot 10^9$	$4.55 \cdot 10^9$	$3.93 \cdot 10^8$
Дисперсия между днями	$1.58 \cdot 10^{10}$	$1.22 \cdot 10^{10}$	$4.94 \cdot 10^{10}$	$1.81 \cdot 10^{10}$	$3.03 \cdot 10^{10}$	$5.93 \cdot 10^{10}$	$1.56 \cdot 10^{10}$
F-критерий	15.13	4.77	66.83	21.70	9.40	13.03	3.98

$(F_{\text{табл.}, 0.05, 1,11}=4.84;$ $F_{\text{табл.}, 0.01, 1,11}=9.65)$							
---	--	--	--	--	--	--	--

4.3 Влияние состава подвижной фазы на прецизионность площадей пиков парабенов

Для изучения зависимости неопределенности площади пика парабена 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. 17).

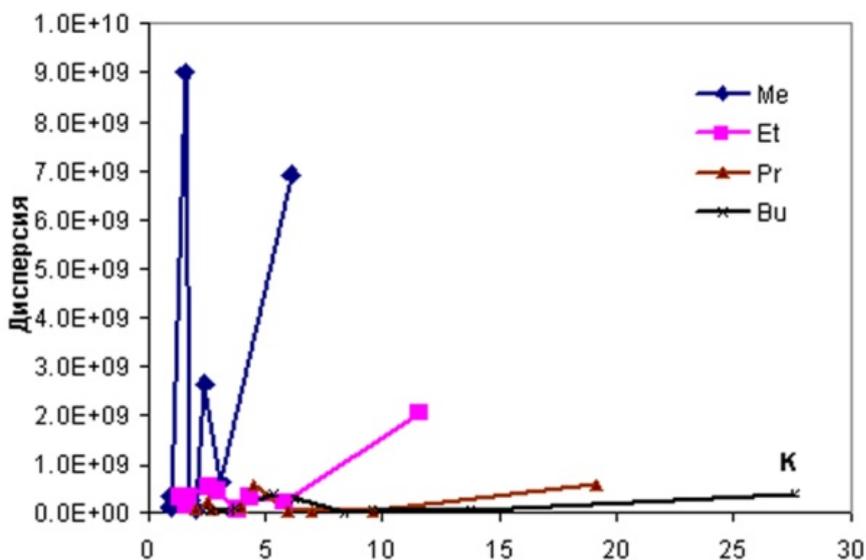


Рисунок 17. Зависимость дисперсии площади пика внутри серий от фактора удерживания парабенов

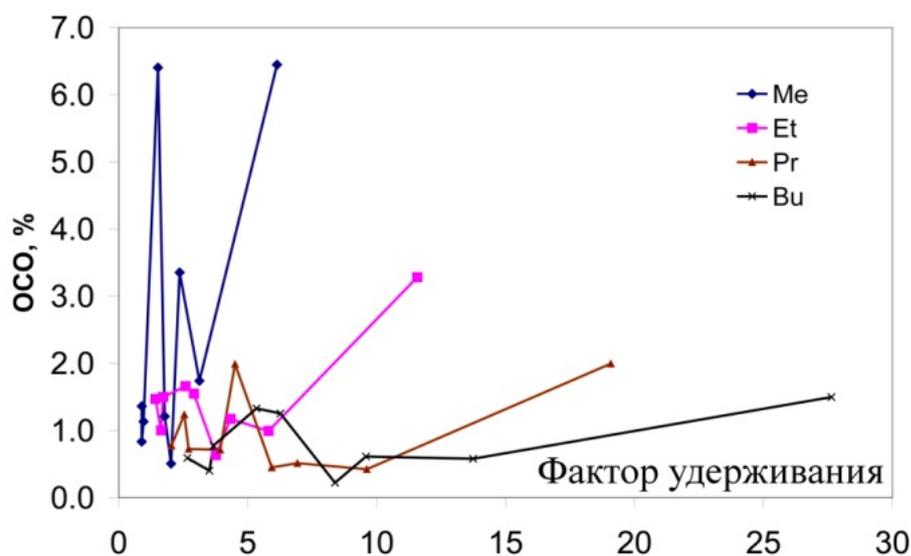


Рисунок 18. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика внутри серий от фактора удерживания парабенов.

Увеличение относительного стандартного отклонения наблюдается для наиболее слабой подвижной фазы (максимальные значения фактора удерживания для каждого парабена, рис. 18). 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.

Значения относительного стандартного отклонения для ПАУ не зависят от величины площади пика, в то время как стандартное отклонение линейно возрастает с увеличением площади. Абсолютные значения относительного стандартного отклонения площади пика оказались ниже, чем для парабенов, приблизительно в 2 раза. Это подтверждает более высокую прецизионность измерения площадей пиков ПАУ.

4.4 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 парабенон 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 парабенон в течение одного дня и нивелировать межсерийный фактор при разделении парабенон. Однако междневной фактор остается значимым (табл. 15).

Таблица 15. Дисперсионный анализ повторяемости площадей пиков парабенон, нормализованных на площадь Pг-парабена

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

Кроме того, использование относительных значений площадей пиков позволило несколько снизить значения относительного стандартного отклонения площадей пиков парабенон (рис. 19).

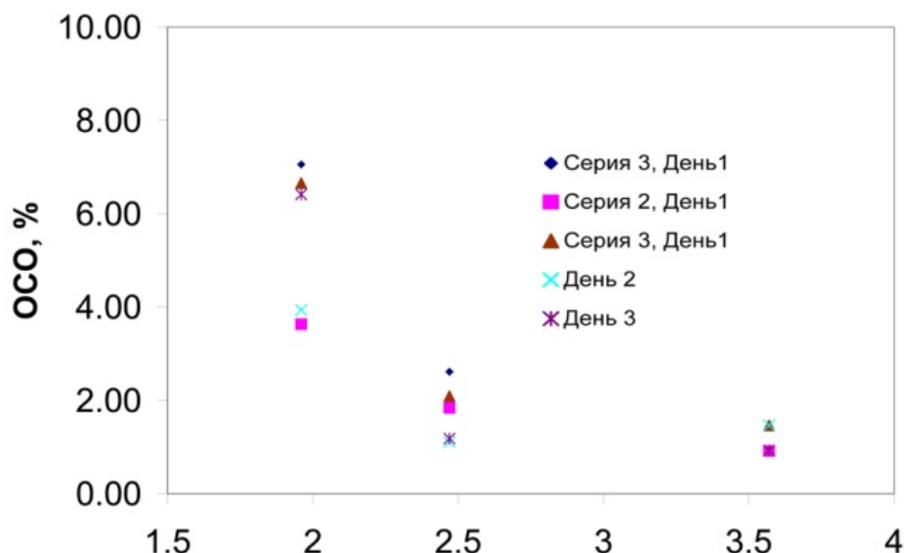


Рисунок 19. Зависимость относительного стандартного отклонения площади пика внутри серий от гидрофобности парабенов.

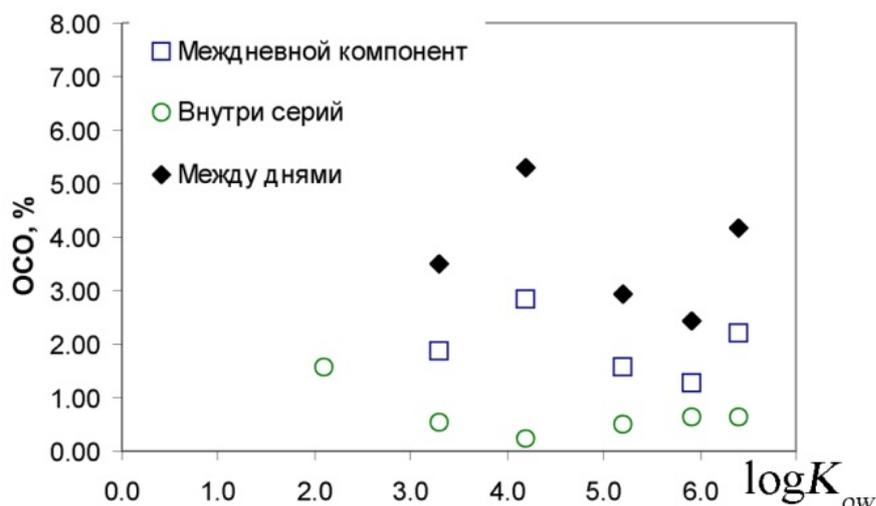


Рисунок 20. Зависимость относительного стандартного отклонения относительной площади пика ПАУ между днями, внутри серий и междневного компонента от гидрофобности ПАУ.

Увеличение прецизионности также наблюдалось и в случае ПАУ (рис. 20). 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 будет составлять менее 1 %.

4.5 Выводы к разделу 4

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 парабиенов по внутреннему стандарту позволило значительно увеличить прецизионность относительных площадей пиков в течение одного дня и нивелировать межсерийный фактор при разделении парабиенов, однако междневной фактор остается значимым. Характеристики прецизионности площадей пиков парабиенов 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.

Приложение А

А1 Аппаратура

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

А2 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.

А3 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 в растворе тетрагидрофуран — 0.1 М раствор SDS в соотношении объемов 1:1. Изократическое разделение проводили при скорости подвижной фазы 0.2 мл/мин. Объем вводимой пробы составлял 5 мкл во всех экспериментах. Детектирование проводилось при 254 нм. Мертвое время определяли в каждом эксперименте отдельно по пику 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].

Примеры полученных хроматограмм для эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты и полиароматических углеводородов представлены на рисунках А1 и А2.

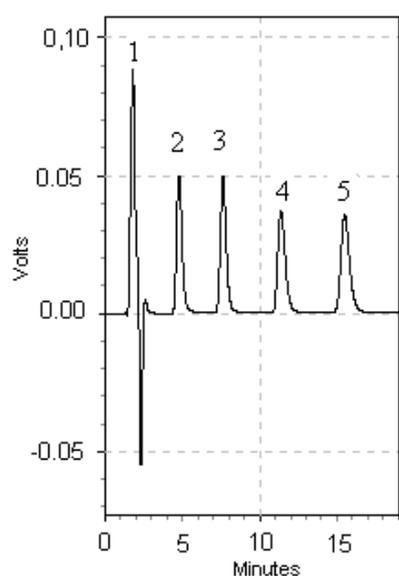


Рис. А1. Типичная хроматограмма смеси эфиров ГБК.

1 – 4-гидроксibenзойная кислота (ГБК),
 2 – метиловый эфир ГБК (Me-парабен),
 3 – этиловый эфир ГБК (Et-парабен),
 4 – пропиловый эфир ГБК (Pr-парабен),
 5 – бутиловый эфир ГБК (Bu-парабен).

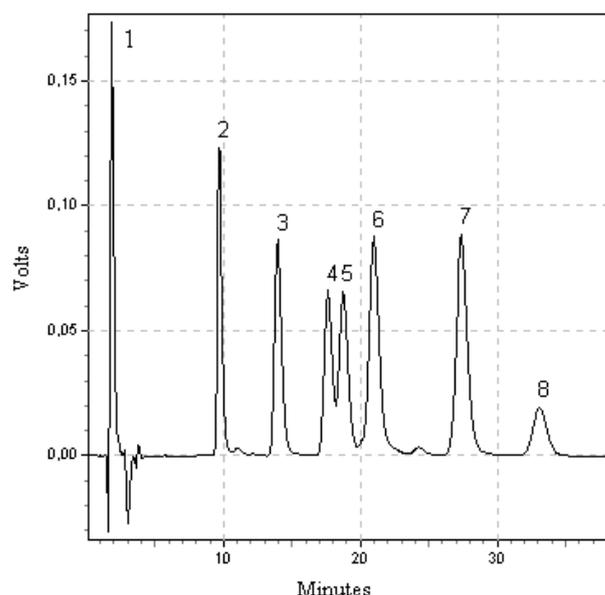


Рис. А2. Типичная хроматограмма смеси ПАУ.

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

А4 Программное обеспечение и базы данных

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

Литература

- [1] Horvath C. Eds. *High-Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*. New York: Academic Press (1980) 339.
- [2] Horvath C. Eds. *High-Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*. New York: Academic Press (1980) 321.
- [3] Fellinger A. *Data Analysis and Signal Processing in Chromatography*. Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Singapore-Tokyo: Elsevier, (1998) 430.
- [4] Lough W.J., Wainer I.W. *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice*. Blackie Academic and Professional, (1995) 288.
- [5] Snyder L.R., Kirkland J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley and Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto (1979) 882.
- [6] Miller J.M. *Chromatography: Concepts and Contrasts*. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley and Sons, 297.
- [7] Beesley T.E., Buglio B., Scott R.P.W. *Quantitative chromatographic analysis*. New York, Basel: Marcel Dekker, (2001) 393.
- [8] Shibamoto T. *Chromatographic analysis of environmental and food toxicants*. New York, Hong Kong: Marcel Dekker, (1998) 338.
- [9] Nollet L.M.L. Eds. *Food Analysis by HPLC*. New York, Basel: Marcel Dekker (2000) 1170.
- [10] Council of Europe, *European Pharmacopoea*. (2004).
- [11] United States Pharmacopoeial Convention Inc., *The United States Pharmacopoeia*. (2004).
- [12] Papadoyannis I.N. *HPLC in Clinical Chemistry*. New York, Basel: Marcel Dekker, (1990) 216.
- [13] Etre L.S. *Nomenclature for Chromatography*. **Pure Appl. Chem.** 65(4) (1993) 819-872.
- [14] Berthod A., García-Alvarez-Coque M.C. *Micellar Liquid Chromatography*. New York, Basel: Marcel Dekker, (2000)
- [15] Loginova L.P., Yakovleva E.Y., Galat M.N., Boichenko A.P. *Effect of aliphatic alcohols and aliphatic carboxylic acids on the critical micelle concentration and counter-ion binding degree of sodium dodecylsulfate*. **J. Mol. Liq.** 145(3) (2009) 177-181.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Loginova L.P., Boichenko A.P., Kulikov A.Y. *Modification of the murakami retention model in reversed-phase high-performance liquid chromatography for micellar chromatographic separations*. **Russ. J. Phys. Chem. A** 82(9) (2008) 1470-1474.

- [19] Le Cong H., Boichenko A.P., Levin I.V., Matveeva A.G., Loginova L.P. *Complexation of Ca²⁺ and Mg²⁺ with aminopropylidenebisphosphonic acids in aqueous and micellar solutions of cetylpyridinium chloride*. **J. Mol. Liq.** (2010).
- [20] 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.
- [21] Boichenko A.P., Markov V.V., Kong H., Matveeva A.G., Loginova L.P. *Re-evaluated data of dissociation constants of alendronic, pamidronic and olpadronic acids*. **Central European Journal of Chemistry** 7(1) (2009) 8-13.
- [22] Boichenko A.P., Kulikov A.U., Loginova L.P., Iwashchenko A.L. *Aliphatic carboxylic acids as new modifiers for separation of 2,4-dinitrophenyl amino acids by micellar liquid chromatography*. **J. Chromatogr. A** 1157(1-2) (2007) 252-259.
- [23] 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.
- [24] Boichenko A.P., Berthod A. *Aliphatic carboxylic acids and alcohols as efficiency and elution strength enhancers in micellar liquid chromatography* **J. Chromatogr. A** 1217((2010) 5665-5673.
- [25] 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.
- [26] Boichenko A.P., Loginova L.P., Kulikov A.U. *Micellar liquid chromatography (Review). Part 1. Fundamentals, retention models and optimization of separation* **Методи и объекты химического анализа** 2(2) (2007) 92-116.
- [27] Boichenko A.P., Sydorenko A.Y., Markov V.V., Loginova L.P. *Linear solvation energy relationships (LSER) for quantitative characteristics and comparison of micellar chromatographic systems* **Kharkov University Bulletin. No. 895. Chemical Series.** 18(41) (2010) 157-165
- [28] Бойченко А.П., А.Л. И. *Воспроизводимость фактора удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии*. **Харк. нац. ун-ту, Серія Хімія.** 13(36) (2005) 107-118.
- [29] Бойченко А.П., Куликов А.Ю., Логинова Л.П. *Алифатические карбоновые кислоты как новые модификаторы для разделения 2,4-динитрофенильных производных аминокислот методом мицеллярной жидкостной хроматографии* **Вісник Харк. нац. ун-ту, Серія Хімія.** 14(37)) (2006) 101-111.
- [30] Бойченко О.П., Логінова Л.П., Куліков А.Ю., Іващенко А.Л., Галат М.М. *Залежності утримування-гідрофобність для конденсованих ароматичних вуглеводнів та естерів п-гідроксибензойної кислоти за даними мицеллярної рідинної хроматографії*. **Ukr. Bioorg. Acta** 5(2) (2007) 3-16.
- [31] Іващенко 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.

[32] Rosen M.J., Dahanayake M. *Industrial Utilization of Surfactants. Principles and Practice.* Urbana: AOAC Press, (2000)

[33] Holmberg K., Shah A., Schwuger M.J. Eds. *Handbook of applied surface and colloid chemistry.* New York: John Wiley and Sons (2002) 1110.

[34] Khan A. *Micellar Catalysis.* Boca Raton, New York, London: CRC/Taylor and Francis, (2007) 482.

[35] 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.

[36] Мчедлов-Петросян Н.О. *Дифференцирование силы органических кислот в истинных и организованных растворах.* Харьков: ХНУ имени В.Н. Каразина, (2004) 326.

[37] Rosen M.J. *Surfactants and interfacial phenomena.* Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, (2004) 444.

[38] Chattopadhyay A.K., Mittal K.L. Eds. *Surfactants in solution.* New York, Basel, Hong Kong: MARCEL DEKKER (1996) 415.

[39] Cecchi T. *Ion Pairing Chromatography and Related Techniques.* Boca Raton, London, New York: CRC Press/Taylor and Francis, (2009) 215.

[40] Eksborg S., Lagerström P.O., Modin R., Schill G. *Ion-pair chromatography of organic compounds.* **J. Chromatogr. A** 83(C) (1973) 99-110.

[41] Gröningsson K. *Thin-layer chromatography of ion pairs on impregnated layers. II. Reversed-phase systems.* **Acta Pharmaceutica Suecica** 7(6) (1970) 635-650.

[42] Wahlund K.G., Gröningsson K. *Reversed-phase column chromatography of organic ammonium compounds as ion pairs.* **Acta Pharmaceutica Suecica** 7(6) (1970) 615-624.

[43] Armstrong D.W., Henry S.J. *Use of an aqueous micellar mobile phases for separation of phenols and polynuclear aromatic hydrocarbons via HPLC.* **J. Liq. Chromatogr.** 3(5) (1980) 657-662.

[44] Armstrong D.W., Nome F. *Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid chromatography.* **Anal. Chem.** 53(11) (1981) 1662-1666.

[45] Armstrong D.W., Stine G.Y. *Selectivity in pseudophase liquid chromatography.* **Anal. Chem.** 55(14) (1983) 2317-2320.

[46] 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.

[47] Boichenko A.P., Berthod A. *Aliphatic carboxylic acids and alcohols as efficiency and elution strength enhancers in micellar liquid chromatography.* **J. Chromatogr. A** (2010).

[48] Cao J., Qu H., Cheng Y. *Micellar and aqueous-organic liquid chromatography using sub-2 μm packings for fast separation of natural phenolic compounds.* **J. Sep. Sci.** 33(13) (2010) 1946-1953.

- [49] Chen L., Zhao Q., Xu Y., Sun L., Zeng Q., Xu H., Wang H., Zhang X., Yu A., Zhang H., Ding L. *A green method using micellar system for determination of sulfonamides in soil.* **Talanta** (2010).
- [50] Chen Y., Wu L.P., Chen C., Ye L.M. *Development of predictive quantitative retention-activity relationship models of alkaloids by mixed micellar liquid chromatography.* **Biomed. Chromatogr.** 24(2) (2010) 195-201.
- [51] Cheng X.W., Jiang W.H., Chu J.X. *Micellar liquid chromatography and its application in toxicological analysis.* **Journal of Forensic Medicine** 26(1) (2010) 56-58+63.
- [52] Chin-Chen M.L., Carda-Broch S., Bose D., Esteve-Romero J. *Direct injection and determination of the active principles of spices using micellar liquid chromatography.* **Food Chem.** 120(3) (2010) 915-920.
- [53] Collado-Sánchez M.A., Rambla-Alegre M., Carda-Broch S., Esteve-Romero J. *Simultaneous separation and determination of quinolones in pharmaceuticals by micellar liquid chromatography.* **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 33(4) (2010) 513-525.
- [54] Dimitrova P., Bart H.J. *Non-ionic surfactant modified ligand exchange chromatography using copper (II) complex of N,N-dimethyl-L-phenylalanine as the chiral additive for enantioselective amino acids separation.* **Anal. Chim. Acta** 663(1) (2010) 109-116.
- [55] Esteve-Romero J., Martinavarro-Domínguez A., Marcos-Tomás J.V., Ochoa-Aranda E., Rambla-Alegre M. *Direct injection of plasma samples and micellar chromatography of procainamide and its metabolite N-acetylprocainamide.* **Chromatographia** 71(3-4) (2010) 273-277.
- [56] Esteve-Romero J., Ochoa-Aranda E., Bose D., Rambla-Alegre M., Peris-Vicente J., Martinavarro-Domínguez A. *Tamoxifen monitoring studies in breast cancer patients by micellar liquid chromatography.* **Anal. Bioanal. Chem.** 397(4) (2010) 1557-1561.
- [57] Gu J., Zeng X., Kong B., Mao Y., Liu W., Wei W. *Rapid Determination of Polyphenols in Tobacco by MLC.* **Chromatographia** 71(9-10) (2010) 769-774.
- [58] Hevia D., Botas C., Sainz R.M., Quiros I., Blanco D., Tan D.X., Gomez-Cordoves C., Mayo J.C. *Development and validation of new methods for the determination of melatonin and its oxidative metabolites by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, using multivariate optimization.* **J. Chromatogr. A** 1217(8) (2010) 1368-1374.
- [59] Kawczak P., Heyden Y.V., Nasal A., Bączek T., Drabczyńska A., Kieć-Kononowicz K., Kaliszan R. *Micellar liquid chromatography for lipophilicity determination of new biologically active 1,3-purinodiones.* **J. Sep. Sci.** 33(11) (2010) 1546-1557.
- [60] Mohammad A., Hena S., Moheman A. *Micellar TLC of inorganic ions: Simultaneous separation of lead(II), zinc(II), and cobalt(II) and spectrophotometric estimation of zinc(II).* **Journal of Planar Chromatography - Modern TLC** 23(2) (2010) 162-165.
- [61] Mohammad A., Sharma S., Bhawani S.A. *Identification of ketoprofen in drug formulation and spiked urine samples by micellar thin layer chromatography and its*

quantitative estimation by high performance liquid chromatography. **International Journal of PharmTech Research** 2(1) (2010) 89-96.

[62] Rambla-Alegre M., Peris-Vicente J., Esteve-Romero J., Carda-Broch S. *Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography with fluorescence detection and validation in accordance with regulation 2002/657/EC.* **Food Chem.** 123(4) (2010) 1294-1302.

[63] Rambla-Alegre M., Peris-Vicente J., Marco-Peiró S., Beltrán-Martinavarró B., Esteve-Romero J. *Development of an analytical methodology to quantify melamine in milk using micellar liquid chromatography and validation according to EU Regulation 2002/654/EC.* **Talanta** 81(3) (2010) 894-900.

[64] Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S., García-Alvarez-Coque M.C. *Peak half-width plots to study the effect of organic solvents on the peak performance of basic drugs in micellar liquid chromatography.* **J. Chromatogr. A** 1217(11) (2010) 1786-1798.

[65] Ruiz-Ángel M.J., Carda-Broch S., García-Álvarez-Coque M.C. *Peak half-width plots to study the effect of organic solvents on the peak performance of basic drugs in micellar liquid chromatography.* **J. Chromatogr. A** (2010).

[66] Theurillat R., Zimmerli S., Thormann W. *Determination of voriconazole in human serum and plasma by micellar electrokinetic chromatography.* **J. Pharm. Biomed. Anal.** (2010).

[67] Wang S.R., Chen C., Xiong M.J., Wu L.P., Ye L.M. *Quantitative retention-activity relationship models of angiotensin converting enzyme inhibitors using biopartitioning micellar chromatography.* **J. Chromatogr. Sci.** 48(2) (2010) 134-139.

[68] Belal F., El-Brashy A., Eid M., Nasr J.J. *Stability-indicating micellar liquid chromatographic method for the determination of clopidogrel. Application to tablets and content uniformity testing.* **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 32(20) (2009) 2993-3008.

[69] Chin-Chen M.L., Esteve-Romero J., Carda-Broch S. *Determination of the insecticide imidacloprid in fruit juices using micellar high-performance liquid chromatography.* **J. AOAC Int.** 92(5) (2009) 1551-1556.

[70] Kartsova L.A., Strel'Nikova E.G. *Effect of organized media on the chromatographic and electrophoretic determination of pharmaceutical preparations in biological samples.* **J. Anal. Chem.** 64(2) (2009) 156-163.

[71] 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.

[72] Lu R., Sun J., Wang Y., He Z. *Quantitative structure-retention relationship studies with biopartitioning micellar chromatography systems by amended linear solvation energy relationships in consideration of electronic factor.* **Chromatographia** 70(1-2) (2009) 21-29.

[73] Lu R., Sun J., Wang Y., Li H., Liu J., Fang L., He Z. *Characterization of biopartitioning micellar chromatography system using monolithic column by linear solvation energy relationship and application to predict blood-brain barrier penetration.* **J. Chromatogr. A** 1216(27) (2009) 5190-5198.

- [74] Martín-Biosca Y., Torres-Cartas S., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. *Biopartitioning micellar chromatography to predict blood to lung, blood to liver, blood to fat and blood to skin partition coefficients of drugs*. **Anal. Chim. Acta** 632(2) (2009) 296-303.
- [75] Mohammad A., Guptai R., Bhawani S.A. *Micelles activated planar chromatographic separation of hydrophilic vitamins*. **Tenside, Surfactants, Deterg.** 46(5) (2009) 267-270.
- [76] Poole C.F., Poole S.K. *Foundations of retention in partition chromatography*. **J. Chromatogr. A** 1216(10) (2009) 1530-1550.
- [77] Rambla-Alegre M., Carda-Broch S., Esteve-Romero J. *Column classification and selection for the determination of antibiotics by micellar liquid chromatography*. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 32(8) (2009) 1127-1140.
- [78] Rambla-Alegre M., Esteve-Romero J., Carda-Broch S. *Validation of a MLC method with fluorescence detection for the determination of quinolones in urine samples by direct injection*. **J. Chromatogr. B** 877(31) (2009) 3975-3981.
- [79] Rambla-Alegre M., Esteve-Romero J., Carda-Broch S. *Analysis of omeprazole and its main metabolites by liquid chromatography using hybrid micellar mobile phases*. **Anal. Chim. Acta** 633(2) (2009) 250-256.
- [80] Ruiz-Ángel M.J., Carda-Broch S., Torres-Lapasió J.R., García-Álvarez-Coque M.C. *Retention mechanisms in micellar liquid chromatography*. **J. Chromatogr. A** 1216(10) (2009) 1798-1814.
- [81] Ruiz-Ángel M.J., Torres-Lapasió J.R., García-Álvarez-Coque M.C., Carda-Broch S. *Submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes applied to the separation of β -blockers*. **J. Chromatogr. A** 1216(15) (2009) 3199-3209.
- [82] Tian M., Row K.H. *Retention factor in micellar liquid chromatography on the basis of linear solvation energy relationships*. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 32(6) (2009) 772-787.
- [83] Zhang N., Li Z., Che W., Xu S., Wang S. *Biopartitioning micellar chromatography to predict dihydropyridine selective calcium channel antagonist toxicity*. **Chromatographia** 70(5-6) (2009) 685-690.
- [84] Alegre M.R., Broch S.C., Romero J.E. *Development and validation of a method to determine amoxicillin in physiological fluids using micellar liquid chromatography*. **J. Sep. Sci.** 31(15) (2008) 2813-2819.
- [85] Gil-Agustí M., Esteve-Romero J., Carda-Broch S. *Anserine and carnosine determination in meat samples by pure micellar liquid chromatography*. **J. Chromatogr. A** 1189(1-2) (2008) 444-450.
- [86] Hadjmohammadi M.R., Kamel K. *Optimization of the separation of quinolines in micellar liquid chromatography by experimental design and regression models*. **Chin. J. Chem.** 26(12) (2008) 2197-2202.

- [87] 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.
- [88] Pous-Torres S., Baeza-Baeza J.J., Torres-Lapasió J.R., García-Álvarez-Coque M.C. *Peak capacity estimation in isocratic elution*. **J. Chromatogr. A** 1205(1-2) (2008) 78-89.
- [89] Rodríguez J.J.S., Ferrera Z.S., Moreno D.V., Padrón M.E.T., Santana C.M. *Recent trends in the use of organized molecular systems combined with chromatographic techniques in environmental analysis*. **Anal. Bioanal. Chem.** 391(3) (2008) 725-733.
- [90] Ruiz-Angel M.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *Micellar liquid chromatography: How to start*. **LC-GC Europe** 21(9) (2008) 420-429.
- [91] Ruiz-Ángel M.J., Torres-Lapasió J.R., García-Álvarez-Coque M.C., Carda-Broch S. *Retention mechanisms for basic drugs in the submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes*. **Anal. Chem.** 80(24) (2008) 9705-9713.
- [92] Szymański A. *Determination of sulfonamide residues in food by micellar liquid chromatography*. **Toxicol. Mech. Methods** 18(6) (2008) 473-481.
- [93] Thomas D.P., Foley J.P. *Improved efficiency in micellar liquid chromatography using triethylamine and 1-butanol as mobile phase additives to reduce surfactant adsorption*. **J. Chromatogr. A** 1205(1-2) (2008) 36-45.
- [94] Tian M., Kyung H.R. *Study of retention in micellar liquid chromatography on a C18 column on the basis of linear solvation energy relationships*. **Bull. Korean Chem. Soc.** 29(5) (2008) 979-984.
- [95] Torres-Lapasió J.R., Ruiz-Ángel M.J., García-Álvarez-Coque M.C., Abraham M.H. *Micellar versus hydro-organic reversed-phase liquid chromatography: A solvation parameter-based perspective*. **J. Chromatogr. A** 1182(2) (2008) 176-196.
- [96] Wang S.R., Chen Y., Wu L.P., Miao W.J., Xiong M.J., Chen C., Zhong Z.R., Ye L.M. *Development of predictive quantitative retention-activity relationship models of HMG-CoA reductase inhibitors by biopartitioning micellar chromatography*. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 46(2) (2008) 243-249.
- [97] Wu L.P., Cui Y., Xiong M.J., Wang S.R., Chen C., Ye L.M. *Mixed micellar liquid chromatography methods: Modelling quantitative retention-activity relationships of angiotensin converting enzyme inhibitors*. **Biomed. Chromatogr.** 22(11) (2008) 1243-1251.
- [98] Wu L.P., Ye L.M., Chen C., Wu J.Q., Chen Y. *Biopartitioning micellar chromatography separation methods: Modelling quantitative retention-activity relationships of cephalosporins*. **Biomed. Chromatogr.** 22(6) (2008) 606-615.
- [99] Baeza-Baeza J.J., Ruiz-Ángel M.J., García-Álvarez-Coque M.C. *Prediction of peak shape in hydro-organic and micellar-organic liquid chromatography as a function of mobile phase composition*. **J. Chromatogr. A** 1163(1-2) (2007) 119-127.
- [100] Bermúdez-Saldaña J.M., Escuder-Gilabert L., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J., Sagrado S. *On the measurement of consistent long-term retention factor*

- values in micellar liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta** 595(1-2 SPEC. ISS.) (2007) 19-27.
- [101] Carda-Broch S., Gil-Agustí M.T., Monferrer-Pons L., Esteve-Romero J.S. *Determination of trazodone in urine and pharmaceuticals using micellar liquid chromatography with fluorescence detection.* **J. Chromatogr. A** 1156(1-2 SPEC. ISS.) (2007) 254-258.
- [102] Ebrahimi P., Hadjmohammadi M.R. *Optimization of the separation of coumarins in mixed micellar liquid chromatography using Derringer's desirability function.* **J. Chemom.** 21(1-2) (2007) 35-42.
- [103] Gil-Agustí M., Carda-Broch S., Monferrer-Pons L., Esteve-Romero J. *Simultaneous determination of tyramine and tryptamine and their precursor amino acids by micellar liquid chromatography and pulsed amperometric detection in wines.* **J. Chromatogr. A** 1156(1-2 SPEC. ISS.) (2007) 288-295.
- [104] Jia H., Yang G., Li Z., Xin P., Zhao Y., Chen Y. *Micellar liquid chromatography with dodecyl dimethyl betaine as an in vitro method for prediction of protein-drug binding.* **J. Chromatogr. A** 1143(1-2) (2007) 88-97.
- [105] Kartsova L.A., Koroleva O.A. *Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins by high-performance thin-layer chromatography using an aqueous micellar mobile phase.* **J. Anal. Chem.** 62(3) (2007) 255-259.
- [106] Kulikov A.U. *Determination of selenium(IV) in pharmaceuticals and premixes by micellar liquid chromatography.* **J. Pharm. Biomed. Anal.** 43(4) (2007) 1283-1289.
- [107] Raviolo M.A., Rambla-Alegre M., Clausell-Tormos J., Capella-Peiró M.E., Carda-Broch S., Esteve-Romero J. *Determination of sulfonamides in milk after precolumn derivatisation by micellar liquid chromatography.* **Anal. Chim. Acta** 593(2) (2007) 152-156.
- [108] Rizk M., Ibrahim F., Hefnawy M., Nasr J.J. *Micellar liquid chromatographic analysis of benzyl alcohol and benzaldehyde in injectable formulations.* **Acta Pharmaceutica** 57(2) (2007) 231-239.
- [109] Simmons R.N., McGuffin V.L. *Modeling transport effects of perfluorinated and hydrocarbon surfactants in groundwater by using micellar liquid chromatography.* **Anal. Chim. Acta** 603(1) (2007) 93-100.
- [110] Srisom P., Liawruangrath B., Liawruangrath S. *Micellar liquid chromatographic determination of penicillins in pharmaceuticals.* **Chromatographia** 65(11-12) (2007) 687-693.
- [111] Thomas D.P., Foley J.P. *Efficiency enhancements in micellar liquid chromatography through selection of stationary phase and alcohol modifier.* **J. Chromatogr. A** 1149(2) (2007) 282-293.
- [112] Torres-Cartas S., Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Comparison between micellar liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the determination of hydrophobic basic drugs in pharmaceutical preparations.* **Biomed. Chromatogr.** 21(1) (2007) 21-28.

- [113] Torres-Cartas S., Martín-Biosca Y., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. *Biopartitioning micellar chromatography to predict mutagenicity of aromatic amines*. **Eur. J. Med. Chem.** 42(11-12) (2007) 1396-1402.
- [114] Vilchez J.L., Navalón A., Araujo L., Prieto A. *Determination of danofloxacin and marbofloxacin in milk samples by micellar liquid chromatography with fluorescence detection*. **Anal. Lett.** 40(3) (2007) 601-613.
- [115] Wang S., Yang G., Zhang H., Liu H., Li Z. *QRAR models for cardiovascular system drugs using biopartitioning micellar chromatography*. **J. Chromatogr. B** 846(1-2) (2007) 329-333.
- [116] Xia B., Ma W., Zhang X., Fan B. *Quantitative structure-retention relationships for organic pollutants in biopartitioning micellar chromatography*. **Anal. Chim. Acta** 598(1) (2007) 12-18.
- [117] Ebrahimi P., Hadjmohammadi M.R. *Simultaneous optimization of resolution and analysis time in mixed micellar liquid chromatography of coumarins by use of a utility function*. **Anal. Bioanal. Chem.** 384(3) (2006) 851-858.
- [118] Fenske M. *Method development for cortisol and cortisone by micellar liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate: Application to urine samples of rugby players [1]*. **J. Chromatogr. Sci.** 44(9) (2006) 579.
- [119] Gil-Agustí M., Carda-Broch S., Capella-Peiró M.E., Esteve-Romero J. *Micellar liquid chromatographic determination of five antianginals in pharmaceuticals*. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 41(4) (2006) 1235-1242.
- [120] Gil-Agustí M., Esteve-Romero J., Abraham M.H. *Solute-solvent interactions in micellar liquid chromatography. Characterization of hybrid micellar systems of sodium dodecyl sulfate-pentanol*. **J. Chromatogr. A** 1117(1) (2006) 47-55.
- [121] Gil-Agustí M.T., Carda-Broch S., Monferrer-Pons L., Esteve-Romero J.S. *Photostability studies for micellar liquid chromatographic determination of nifedipine in serum and urine samples*. **Biomed. Chromatogr.** 20(2) (2006) 154-160.
- [122] Hadjmohammadi M.R., Jafari S. *Separation of biojenic amines using dansyl chloride derivatization and mixed micellar liquid chromatography*. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering** 25(1) (2006) 19-23.
- [123] Hadjmohammadi M.R., Rezaie M. *A study on retention of a series of aromatic compounds in mixed micellar liquid chromatography using linear solvation energy relationship (LSER)*. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering** 25(1) (2006) 13-18.
- [124] Martínez-Algaba C., Bermúdez-Saldaña J.M., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. *Analysis of pharmaceutical preparations containing antihistamine drugs by micellar liquid chromatography*. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 40(2) (2006) 312-321.
- [125] Momenbeik F., Khorasani J.H. *Analysis of sugars by micellar liquid chromatography with UV detection*. **Acta Chromatographica** 16) (2006) 58-69.

- [126] Rambla-Alegre M., Gil-Agustí M.T., Capella-Peiró M.E., Carda-Broch S., Esteve-Romero J.S. *Direct determination of verapamil in urine and serum samples by micellar liquid chromatography and fluorescence detection.* **J. Chromatogr. B** 839(1-2) (2006) 89-94.
- [127] Rukhadze M.D., Sebiskveradze M.V., Akhalkatsi T.G. *Imitation of artificial membrane system via mobile phases with Tween-80 and cholic acid in biopartitioning micellar chromatography.* **Biomed. Chromatogr.** 20(8) (2006) 753-759.
- [128] Samokhina L., Loginova L., Stepanko D. *The quantitative characterization of chemical modification of sodium dodecyl sulphate micellar solutions and retention model in micellar liquid chromatography.* **Tenside, Surfactants, Deterg.** 43(1) (2006) 6-11.
- [129] Szymański A., Rykowska I., Wasiak W. *Determination of bisphenol A in water and milk by micellar liquid chromatography.* **Acta Chromatographica** 17) (2006) 161-172.
- [130] Wang S., Yang G., Li Z., Haiyan L., Bai J., Zhang Y. *Micellar liquid chromatography study of quantitative retention-activity relationships for antihypertensive drugs.* **Chromatographia** 64(1-2) (2006) 23-29.
- [131] Bermúdez-Saldaña J.M., Escuder-Gilabert L., Medina-Hernández M.J., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S. *Modelling bioconcentration of pesticides in fish using biopartitioning micellar chromatography.* **J. Chromatogr. A** 1063(1-2) (2005) 153-160.
- [132] Bermúdez-Saldaña J.M., Escuder-Gilabert L., Medina-Hernández M.J., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S. *Chromatographic evaluation of the toxicity in fish of pesticides.* **J. Chromatogr. B** 814(1) (2005) 115-125.
- [133] Bose D., Durgbanshi A., Carda-Broch S., Gil-Agustí M., Capella-Peiró M.E., Esteve-Romero J. *Direct injection analysis of epinephrine, norepinephrine, and their naturally occurring derivatives in serum by micellar liquid chromatography with electrochemical detection.* **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 28(20) (2005) 3265-3281.
- [134] Bose D., Durgbanshi A., Martinavarro-Domínguez A., Capella-Peiró M.E., Carda-Broch S., Esteve-Romero J., Gil-Agustí M. *Amitriptyline and nortriptyline serum determination by micellar liquid chromatography.* **J. Pharmacol. Toxicol. Methods** 52(3) (2005) 323-329.
- [135] Bose D., Durgbanshi A., Martinavarro-Domínguez A., Capella-Peiró M.E., Carda-Broch S., Esteve-Romero J.S., Gil-Agustí M.T. *Rapid determination of acetaminophen in physiological fluids by liquid chromatography using SDS mobile phase and ED detection.* **J. Chromatogr. Sci.** 43(6) (2005) 313-318.
- [136] Canós-Rius N., Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Estimation of the effect of the acidosis and alkalosis on the anesthetic potency of local anesthetics by biopartitioning micellar chromatography and micellar electrokinetic chromatography.* **Eur. J. Med. Chem.** 40(2) (2005) 215-223.
- [137] Capella-Peiró M.E., Bose D., Durgbanshi A., Adrià M.D., Mayte G.A., Josep E.R., Samuel C.B. *Simultaneous determination of three opiates in serum by micellar liquid chromatography using direct injection.* **J. AOAC Int.** 88(2) (2005) 428-435.

- [138] El-Sherbiny D.T., Eid M.I., El-Wasseef D.R., Al-Ashan R.M., Belal F. *Analysis of flunarizine in the presence of some of its degradation products using micellar liquid chromatography (MLC) or microemulsion liquid chromatography (MELC) - Application to dosage forms.* **J. Sep. Sci.** 28(2) (2005) 197-202.
- [139] Escuder-Gilbert L., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Quantitative structure-retention relationships for ionic and non-ionic compounds in biopartitioning micellar chromatography.* **Biomed. Chromatogr.** 19(2) (2005) 155-168.
- [140] Esteve-Romero J., Carda-Broch S., Gil-Agustí M., Capella-Peiró M.E., Bose D. *Micellar liquid chromatography for the determination of drug materials in pharmaceutical preparations and biological samples.* **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** 24(2) (2005) 75-91.
- [141] Izquierdo-Hornillos R., Gonzalo-Lumbreras R., Santos-Montes A. *Method development for cortisol and cortisone by micellar liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate: Application to urine samples of rugby players.* **J. Chromatogr. Sci.** 43(5) (2005) 235-240.
- [142] Jaworska M., Szulińska Z., Wilk M., Anuszevska E. *Separation of synthetic food colourants in the mixed micellar system: Application to pharmaceutical analysis.* **J. Chromatogr. A** 1081(1 SPEC. ISS.) (2005) 42-47.
- [143] 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.
- [144] Mao J., Sun J., Li J., Gao K., He Z. *The retention behavior of solutes in anionic micellar liquid chromatography.* **Fenxi Huaxue** 33(9) (2005) 1247-1251.
- [145] Mao J.J., Sun J., He Z.G. *Biopartitioning micellar chromatography: its application in evaluating drug membrane transport and activity.* **Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica** 40(10) (2005) 865-870.
- [146] Memon N., Bhangar M.I., Khuhawer M.Y. *Determination of preservatives in cosmetics and food samples by micellar liquid chromatography.* **J. Sep. Sci.** 28(7) (2005) 635-638.
- [147] Mohammad A., Luqman M. *Thin-layer chromatography of certain metal cations with nonionic surfactant mediated mobile phase systems: Separation of co-existing chromium(VI), manganese(II) and iron(III).* **J. Indian Chem. Soc.** 82(1) (2005) 55-59.
- [148] Momenbeik F., Momeni Z., Khorasani J.H. *Separation and determination of Vitamins E and A in multivitamin syrup using micellar liquid chromatography and simplex optimization.* **J. Pharm. Biomed. Anal.** 37(2) (2005) 383-387.
- [149] Ruiz Ángel M.J., Gil Agustí M.T., Esteve Romero J.S., Carda Broch S. *Photodegradation and photostability studies of bendroflumethiazide (BFMT) in pharmaceutical formulations and urine samples by micellar liquid chromatography.* **LC-GC Europe** 18(1) (2005) 32-40.

- [150] Rukhadze M.D., Bezarashvili G.S., Kutkhashvili M.G., Sigua K.I. *Investigation of artificial biomembrane systems in biopartitioning micellar chromatography by method of mathematical design.* **Biomed. Chromatogr.** 19(2) (2005) 169-177.
- [151] Safa F., Hadjmohammadi M.R. *Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin amino acids using Derringer's desirability function.* **J. Chromatogr. A** 1078(1-2) (2005) 42-50.
- [152] Safa F., Hadjmohammadi M.R. *Chemometric approach in optimization of micellar liquid chromatographic separation of some halogenated phenols.* **Anal. Chim. Acta** 540(1) (2005) 121-126.
- [153] Bermúdez-Saldaña J.M., Escuder-Gilabert L., Medina-Hernández M.J., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S. *Chromatographic retention-activity relationships for prediction of the toxicity pH-dependence of phenols.* **Chemosphere** 69(1) (2007) 108-117.
- [154] Bermúdez-Saldaña J.M., Escuder-Gilabert L., Medina-Hernández M.J., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S. *Biopartitioning micellar chromatography: An alternative high-throughput method for assessing the ecotoxicity of anilines and phenols.* **J. Chromatogr. B** 852(1-2) (2007) 353-361.
- [155] Cimpean D.M., Poole C.F. *Systematic search for surrogate chromatographic models of biopartitioning processes.* **Analyst** 127(6) (2002) 724-729.
- [156] Diniz A., Escuder-Gilabert L., Lopes N.P., Gobbo-Neto L., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. *Permeability profile estimation of flavonoids and other phenolic compounds by biopartitioning micellar capillary chromatography.* **J. Agric. Food Chem.** 55(21) (2007) 8372-8379.
- [157] Escuder-Gilabert L., Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Biopartitioning micellar chromatography to predict ecotoxicity.* **Anal. Chim. Acta** 448(1-2) (2001) 173-185.
- [158] Escuder-Gilabert L., Martínez-Pla J.J., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Biopartitioning micellar separation methods: Modelling drug absorption.* **J. Chromatogr. B** 797(1-2) (2003) 21-35.
- [159] Escuder-Gilabert L., Molero-Monfort M., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. *Potential of biopartitioning micellar chromatography as an in vitro technique for predicting drug penetration across the blood-brain barrier.* **J. Chromatogr. B** 807(2) (2004) 193-201.
- [160] Escuder-Gilabert L., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S., Medina-Hernandez M.J. *Permeability and toxicological profile estimation of organochlorine compounds by biopartitioning micellar chromatography.* **Biomed. Chromatogr.** 23(4) (2009) 382-389.
- [161] Gil C., Dorronsoro I., Castro A., Martinez A. *Good oral absorption prediction on non-nucleoside benzothiadiazine dioxide human cytomegalovirus inhibitors using combined chromatographic and neuronal network techniques.* **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** 15(7) (2005) 1919-1921.

- [162] Hu Z., Zhang W., He H., Feng Y., Da S. *Profiling of permeable compounds in ligusticum chuanxiong by biopartitioning micellar chromatography*. **Chromatographia** 69(7-8) (2009) 637-644.
- [163] Kaliszan R., Nasal A., Markuszewski M.J. *New approaches to chromatographic determination of lipophilicity of xenobiotics*. **Anal. Bioanal. Chem.** 377(5) (2003) 803-811.
- [164] Lucangioli S.E., Carducci C.N., Scioscia S.L., Carlucci A., Bregni C., Kenndler E. *Comparison of the retention characteristics of different pseudostationary phases for microemulsion and micellar electrokinetic chromatography of betamethasone and derivatives*. **Electrophoresis** 24(6) (2003) 984-991.
- [165] Ma W., Luan F., Zhang H., Zhang X., Liu M., Hu Z., Fan B. *Quantitative structure-property relationships for pesticides in biopartitioning micellar chromatography*. **J. Chromatogr. A** 1113(1-2) (2006) 140-147.
- [166] Martín-Biosca Y., Molero-Monfort M., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Development of predictive retention-activity models of butyrophenones by biopartitioning micellar chromatography*. **Biomed. Chromatogr.** 15(5) (2001) 334-341.
- [167] Martín-Biosca Y., Molero-Monfort M., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Rapid in vitro test to predict ocular tissue permeability based on biopartitioning micellar chromatography*. **Eur. J. Pharm. Sci.** 20(2) (2003) 209-216.
- [168] Martínez-Pla J.J., Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability*. **Biomed. Chromatogr.** 17(8) (2003) 530-537.
- [169] Martínez-Pla J.J., Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Evaluation of the pH effect of formulations on the skin permeability of drugs by biopartitioning micellar chromatography*. **J. Chromatogr. A** 1047(2) (2004) 255-262.
- [170] Martínez-Pla J.J., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Retention-property relationships of anticonvulsant drugs by biopartitioning micellar chromatography*. **J. Chromatogr. B** 757(1) (2001) 89-99.
- [171] Molero-Monfort M., Escuder-Gilabert L., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. *Biopartitioning micellar chromatography: An in vitro technique for predicting human drug absorption*. **J. Chromatogr. B** 753(2) (2001) 225-236.
- [172] Poole S.K., Poole C.F. *Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients*. **J. Chromatogr. B** 797(1-2) (2003) 3-19.
- [173] Quiñones-Torrelo C., Martín-Biosca Y., Martínez-Pla J.J., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *QRAR models for central nervous system drugs using biopartitioning micellar chromatography*. **Mini reviews in medicinal chemistry** 2(2) (2002) 145-161.
- [174] Quiñones-Torrelo C., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Retention pharmacokinetic and pharmacodynamic parameter relationships of antihistamine*

drugs using biopartitioning micellar chromatography. **J. Chromatogr. B** 761(1) (2001) 13-26.

[175] Quiñones-Torrelo C., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Opioid analgetics retention-pharmacologic activity models using biopartitioning micellar chromatography*. **J. Chromatogr. B** 766(2) (2002) 265-277.

[176] Quiñones-Torrelo C., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Efficiency of antidepressant drugs as monoamine reuptake inhibitors: Analysis of the hydrophobicity influence using biopartitioning micellar chromatographic data*. **Biomed. Chromatogr.** 18(7) (2004) 427-435.

[177] Quiñones-Torrelo C., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. *Role of hydrophobicity on the monoamine receptor binding affinities of central nervous system drugs: A quantitative retention-activity relationships analysis using biopartitioning micellar chromatography*. **J. Chromatogr. B** 801(2) (2004) 185-198.

[178] Sun J., Wu X., Lu R., Liu J., Wang Y., He Z. *Profiling drug membrane permeability and activity via biopartitioning chromatography*. **Curr. Drug Metab.** 9(2) (2008) 152-166.

[179] Tsunoda M., Takezawa K., Yanagisawa T., Kato M., Imai K. *An LD50 model for predicting psychotropic drug toxicity using biopartitioning micellar chromatography*. **Biomed. Chromatogr.** 15(1) (2001) 31-40.

[180] Wang S.M., Yang G.L., Li Z.W., Liu H.Y., Guo H.J. *Applying theoretical approach for predicting the selective calcium channel blockers pharmacological parameter by biopartitioning micellar chromatography*. **Chin. J. Chem.** 24(6) (2006) 755-760.

[181] Wu L.P., Chen Y., Wang S.R., Chen C., Ye L.M. *Quantitative retention-activity relationship models for quinolones using biopartitioning micellar chromatography*. **Biomed. Chromatogr.** 22(1) (2008) 106-114.

[182] Wu L.P., Wang S.R., Chen Y., Chen C., Wu J.Q., Ye L.M. *Study on quantitative retention-activity relationship models of β -lactam antibiotics by biopartitioning micellar chromatography*. **Chinese Pharmaceutical Journal** 43(7) (2008) 544+545-550.

[183] Marina M.L., Garcia M.A. *Micellar liquid chromatography*. in: *Level II: Methods and Instrumentation* Elsevier (2000) 726-737.

[184] Pramauro E., Pelizzetti E. *Micellar chromatography*. in: *Surfactants in Analytical Chemistry*. Elsevier (1996) 323-391.

[185] Berthod A. *Causes and remediation of reduced efficiency in micellar liquid chromatography*. **J. Chromatogr. A** 780(1-2) (1997) 191-206.

[186] Carda-Broch S., García-Alvarez-Coque M.C., Simó-Alfonso E.F., Esteve-Romero J.S. *Micellar liquid chromatographic determination of diuretics by diazotization and coupling with the Bratton-Marshall reagent*. **Anal. Chim. Acta** 353(2-3) (1997) 215-226.

[187] García-Alvarez-Coque M.C., Torres-Lapasió 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.

- [188] Jiménez O., Marina M.L. *Retention modeling in micellar liquid chromatography*. **J. Chromatogr. A** 780(1-2) (1997) 149-163.
- [189] Khaledi M.G. *Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: Overview and perspective*. **J. Chromatogr. A** 780(1-2) (1997) 3-40.
- [190] Куликов А.Ю., Логинова Л.П., Самохина Л.В. *Мицеллярная жидкостная хроматография в фармацевтическом анализе*. **ФАРМАКОМ** 4(1) (2004) 22-52.
- [191] The International Bureau of Weights and Measures <http://www.bipm.org/>, (2010).
- [192] ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006, *Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий*. (2006) 32.
- [193] JCGM 200:2008, *International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)*. JCGM 200 (2008) 104.
- [194] Логинова 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», Одесса (2006) 50-51.
- [195] 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.
- [196] Ellison S.L.R., Rosslein M., Williams A. Eds. *EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. <http://www.measurementuncertainty.org/mu/QUAM2000-1.pdf>: EURACHEM/CITAC (2000) 126.
- [196a] The fitness of purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. EURACHEM guide, (1998) 75.
- [197] JCGM 100:2008, *Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement*. (1995) 134.
- [198] JCGM 101:2008, *Evaluation of measurement data — Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” — Propagation of distributions using a Monte Carlo method*. (2008) 90.
- [199] JCGM 104:2009, *Evaluation of measurement data — An introduction to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” and related documents*. JCGM 2009 (2009) 28.
- [200] ГОСТ Р ИСО 9000-2001, *Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь*. (2001).
- [201] ISO 9001:2000(E), *Quality management systems — Requirements*. 32.
- [202] ГОСТ Р 52361-2005 *Контроль объекта аналитический. Термины и определения*. (2005) 34.

- [203] Stöckl D., D'Hondt H., Thienpont L.M. *Method validation across the disciplines- Critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols*. **J. Chromatogr. B** 877(23) (2009) 2180-2190.
- [204] 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.
- [205] *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. **Pure Appl. Chem.** 74(5) (2002) 835 - 855.
- [206] Technical Note 17, *Guidelines for the validation and verification of chemical test methods*. (2009) 11.
- [207] ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 *Точность (правильность и прецизионность) методов. Часть 1. Основные положения и определения*. (2002) 32.
- [208] РМГ 29-99 *Метрология. Основные термины и определения*. 134.
- [209] IUPAC <http://goldbook.iupac.org/>, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology (Gold Book) 2009-09-07: Release 2.1.5*.
- [210] *Державна Фармакопея України/Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр"*. Харків: PIPEГ, (2001) 556.
- [211] Hibbert D.B., Minkinen P., Faber N.M., Wise B.M. *IUPAC project: A glossary of concepts and terms in chemometrics*. **Anal. Chim. Acta** 642(1-2) (2009) 3-5.
- [212] Konieczka P., Namieśnik J. *Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques*. **J. Chromatogr. A** 1217(6) (2010) 882-891.
- [213] Ishikawa K. *Introduction to Quality Control*. Productivity Press, (1990)
- [214] Boti V.I., Sakkas V.A., Albanis T.A. *Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples. Part I: Ultrasonic extraction from diverse sediment matrices*. **J. Chromatogr. A** 1146(2) (2007) 139-147.
- [215] Campos Giménez E., Populaire S. *Use of validation data for fast and simple estimation of measurement uncertainty in liquid chromatography methods*. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 28(19) (2005) 3005-3013.
- [216] Clough R., Belt S.T., Fairman B., Catterick T., Evans E.H. *Uncertainty contributions to single and double isotope dilution mass spectrometry with HPLC-CV-MC-ICP-MS for the determination of methylmercury in fish tissue*. **J. Anal. At. Spectrom.** 20(10) (2005) 1072-1075.
- [217] Dabalus Islam M., Schweikert Turcu M., Cannavan A. *Comparison of methods for the estimation of measurement uncertainty for an analytical method for sulphonamides*. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment** 25(12) (2008) 1439-1450.
- [218] Delgado B., Ayala J.H., González V., Afonso A.M. *Estimation of uncertainty in the analysis of carbonyl compounds by HPLC-UV using DNPH derivatization*. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 31(3) (2008) 361-381.

- [219] Dias M.G., Camões M.F.G.F.C., Oliveira L. *Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production.* **Food Chem.** 109(4) (2008) 815-824.
- [220] Hu P., Luo G.A., Zhao Z.Z., Chan K.K.C., Jiang Z.H. *Evaluation of measurement uncertainty for the determination of ginsenosides in Radix ginseng by HPLC.* **Yaoyue Xuebao** 40(1) (2005) 49-53.
- [221] Hu Z., Wang Y., Luo G., He L. *Estimation of measurement uncertainty of analytical results for the determination of three active components from Gardenia jasminoides Ellis. by HPLC.* **Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials.** 28(11) (2005) 991-994.
- [222] Kitajima A., Kashirajima T., Minamizawa T., Sato H., Iwaki K., Ueda T., Kimura Y., Toyooka T., Maitani T., Matsuda R., Hayashi Y. *Baseline noise and measurement uncertainty in liquid chromatography.* **Anal. Sci.** 23(9) (2007) 1077-1080.
- [223] Kmellár B., Fodor P., Pareja L., Ferrer C., Martínez-Uroz M.A., Valverde A., Fernandez-Alba A.R. *Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* **J. Chromatogr. A** 1215(1-2) (2008) 37-50.
- [224] Kristl J., Krajncič B., Brodnjak-Vončina D., Veber M. *Evaluation of measurement uncertainty in the determination of jasmonic acid in Lemna minor L. by liquid chromatography with fluorescence detection.* **Accreditation and Quality Assurance** 12(6) (2007) 303-310.
- [225] Leito S., Mölder K., Künnapas A., Herodes K., Leito I. *Uncertainty in liquid chromatographic analysis of pharmaceutical product: Influence of various uncertainty sources.* **J. Chromatogr. A** 1121(1) (2006) 55-63.
- [226] Liu S.Y., Hu C.Q. *A comparative uncertainty study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balance methods.* **Anal. Chim. Acta** 602(1) (2007) 114-121.
- [227] Marini R.D., Chiap P., Boulanger B., Rudaz S., Rozet E., Crommen J., Hubert P. *Comparison of three approaches for uncertainty estimation.* **Comparaison de trois approches pour l'estimation de l'incertitude.** 1) (2006) 60-62.
- [228] Meyer V.R. *Measurement uncertainty.* **J. Chromatogr. A** 1158(1-2) (2007) 15-24.
- [229] Nocentini M., Focardi C., Ninci S., Biancalani G. *Comparison between two different approaches in the uncertainty estimation for the chromatographic analysis of aflatoxin M1: From single laboratory validation data and from proficiency test results.* **World Mycotoxin Journal** 2(4) (2009) 381-390.
- [230] Verma R.S., Tripathi R.M., Dalela A.K. *Uncertainty measurement in quantitative estimation of street sample of heroin (DAM) and its importance.* **Journal of Forensic Medicine and Toxicology** 25(1) (2008) 32-34.
- [231] *Quantification of uncertainty of peptide retention time predictions from a sequence-based model in LC-MS/MS proteomics experiments.* (2007) 1221-1224.

- [232] Hibbert D.B., Jiang J., Mulholland M.I. *Propagation of uncertainty in high-performance liquid chromatography with UV-VIS detection*. **Anal. Chim. Acta** 443(2) (2001) 205-214.
- [233] Barwick V.J. *Sources of uncertainty in gas chromatography and high-performance liquid chromatography*. **J. Chromatogr. A** 849(1) (1999) 13-33.
- [234] Схунмакерс П. *Оптимизация селективности в хроматографии*. Москва: Мир, (1989) 399.
- [235] Katz E. Eds. *Quantitative Analysis using Chromatographic Techniques*. Chichester: Wiley (1987).
- [236] Scott R.P.W. *Liquid Chromatography Detectors*. Amsterdam: Elsevier, (1986)
- [237] Hund E., Massart D.L., Smeyers-Verbeke J. *Comparison of different approaches to estimate the uncertainty of a liquid chromatographic assay*. **Anal. Chim. Acta** 480(1) (2003) 39-52.
- [238] Barwick, V.J., Ellison, S.L.R., VAM Project 3.2.1, Development of Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles. Part d. Protocol for Uncertainty Evaluation from Validation Data, Version 5.1, <http://www.caeal.ca/VAM20uncertainty.pdf>. (January 2000).
- [239] Barwick V.J., Ellison S.L.R. *Estimating measurement uncertainty using a cause and effect and reconciliation approach Part 2. † Measurement uncertainty estimates compared with collaborative trial expectation ‡*. **Analytical Communications** 35(11) (1998) 377-383.
- [240] Barwick V.J., Ellison S.L.R. *The evaluation of measurement uncertainty from method validation studies - Part 1: Description of a laboratory protocol*. **Accreditation and Quality Assurance** 5(2) (2000) 47-53.
- [241] Barwick V.J., Ellison S.L.R., Lucking C.L., Burn M.J. *Experimental studies of uncertainties associated with chromatographic techniques*. **J. Chromatogr. A** 918(2) (2001) 267-276.
- [242] Barwick V.J., Ellison S.L.R., Rafferty M.J.Q., Gill R.S. *The evaluation of measurement uncertainty from method validation studies: Part 2 - The practical application of a laboratory protocol*. **Accreditation and Quality Assurance** 5(3) (2000) 104-113.
- [243] 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.
- [244] Ellison S.L.R., Barwick V.J. *Estimating measurement uncertainty: Reconciliation using a cause and effect approach*. **Accreditation and Quality Assurance** 3(3) (1998) 101-105.
- [245] Шатц В.Д., Сахартова О.В. *Высокоэффективная жидкостная хроматография* Рига: Зинанте, (1988) 390.
- [246] Dorsey J.G., Khaledi M.G. *Hydrophobicity estimations by reversed-phase liquid chromatography. Implications for biological partitioning processes*. **J. Chromatogr. A** 656(1-2) (1993) 485-499.

- [247] Vitha M., Carr P.W. *The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography*. **J. Chromatogr. A** 1126(1-2) (2006) 143-194.
- [248] Li J. *Evaluation of a semi-empirical approach to correlation of retention with octanol-water partition coefficients by use of adjustable hydrogen-bonding indicator variables*. **Chromatographia** 61(9-10) (2005) 479-492.
- [249] Poole C.F., Atapattu S.N., Poole S.K., Bell A.K. *Determination of solute descriptors by chromatographic methods*. **Anal. Chim. Acta** 652(1-2) (2009) 32-53.
- [250] Poole C.F., Katsuta S. *Relationship between liquid-liquid distribution and liquid-micelle distribution systems*. **J. Chromatogr. A** 807(2) (1998) 307-310+311.
- [251] Jiskra J., Claessens H.A., Cramers C.A., Kaliszan R. *Quantitative structure-retention relationships in comparative studies of behavior of stationary phases under high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography conditions*. **J. Chromatogr. A** 977(2) (2002) 193-206.
- [252] Nasal A., Kaliszan R. *Progress in the use of HPLC for evaluation of lipophilicity*. **Curr. Comput.-Aided Drug Des.** 2(4) (2006) 327-340.
- [253] Jandera P., Churáček J. *Gradient elution in liquid chromatography. III. Verification of the theoretical relationships for elution characteristics (retention volume, band width and resolution) in isocratic and gradient elution chromatography on silica*. **J. Chromatogr. A** 93(1) (1974) 17-39.
- [254] Jandera P., Churáček J. *Gradient elution in liquid chromatography. I. The influence of the composition of the mobile phase on the capacity ratio (retention volume, band width, and resolution) in isocratic elution - theoretical considerations*. **J. Chromatogr. A** 91(C) (1974) 207-221.
- [255] Jandera P., Churáček J. *Gradient elution in liquid chromatography. VI. Cation-exchange chromatography of N,N-dimethyl-p-aminobenzeneazobenzoyl esters and amides in mixed aqueous-organic solutions - influence of the composition of the mobile phase on retention characteristics and practical examples of separation*. **J. Chromatogr. A** 104(2) (1975) 257-269.
- [256] Murakami F. *Retention behaviour of benzene derivatives on bonded reversed-phase columns*. **J. Chromatogr. A** 178(2) (1979) 393-399.
- [257] Snyder L.R. *Principals of adsorption chromatography*. New York: Marcel Dekker, (1968)
- [258] Soczewiński E. *Solvent composition effects in thin-layer chromatography systems of the type silica gel-electron donor solvent*. **Anal. Chem.** 41(1) (1969) 179-182.
- [259] Дворкин В.И. *Метрология и обеспечение качества количественного химического анализа*. Москва: Химия, (2001) 263.
- [260] Konnert A., Berding C. *The statistical basis of standardization designs for diagnostic assays*. **Accreditation and Quality Assurance** 9(8) (2004) 457-463.
- [261] Лемешко Б.Ю. *Робастные методы оценивания и отбраковка аномальных измерений*. **Заводская лаборатория** 63(5) (1997) 43-49.

- [262] Мюллер П., Нойман П., Шторм Р. *Таблицы по математической статистике*. Москва: Финансы и статистика, (1982) 278.
- [263] Большев Л.Н., Смирнов Н.В. *Таблицы математической статистики*. Москва: Наука, (1983) 416.
- [264] Налимов В.В. *Применение математической статистики при анализе веществ*. Москва: Гос. изд. физ.-мат. лит., (1960) 430.
- [265] Дерффель К. *Статистика в аналитической химии*. Москва: Мир, (1994) 268.
- [266] Sheskin D. *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures* Chapman & Hall/CRC, (2004)
- [267] Bolton S., Bon C. *Pharmaceutical statistics. Practical and clinical application.*: Taylor and Francis, (2009)
- [268] García-Alvarez-Coque M.C., Torres-Lapasió J.R., Baeza-Baeza J.J. *Description of the partitioning behaviour of solutes and data treatment in micellar liquid chromatography with modifiers*. **Anal. Chim. Acta** 324(2-3) (1996) 163-173.
- [269] Vivy-Truyols G., Concha-Herrera V., Torres-Lapasió J.R., García-Alvarez-Coque M.C. *Robust interpretive optimisation in high-performance liquid chromatography considering uncertainties in peak position*. **J. Chromatogr. A** 1096(1-2) (2005) 123-132.
- [270] Мостеллер Ф., Тьюки Д. *Анализ данных и регрессия*. . Москва: Финансы и статистика, 1 (1982) 317.
- [271] Мостеллер Ф., Тьюки Д. *Анализ данных и регрессия*. Москва: Финансы и статистика, 2 (1982) 318.
- [272] Дрейпер Н., Смит Г. *Прикладной регрессионный анализ*. Москва: Финансы и статистика, 1 (1986) 366.
- [273] Дрейпер Н., Смит Г. *Прикладной регрессионный анализ*. Москва: Финансы и статистика, (1987) 382.
- [274] Худсон Д. *Статистика для физиков: Лекции по теории вероятностей и элементарной статистике*. Москва: Мир, (1967) 242.
- [275] 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.
- [276] Логинова Л.П., Бойченко А.П., Иващенко А.Л., Куликов А.Ю. *Адекватность и предсказательная способность моделей удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии* II Междунар. симпозиум «Методы химического анализа» Ужгород, Украина (2005) 4-5.
- [277] Myers J., Well A.D. *Research design and statistical analysis* New Jersey, London: Lawrence Erlbaum Associates, (2003) 760.
- [278] Berthod A., Carda-Broch S. *Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods*. **J. Chromatogr. A** 1037((2004) 3-14.

- [279] Escuder-Gilabert L., Martín-Biosca Y., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J., Sagrado S. *The chromatographic quantification of hydrophobicity using micellar mobile phases*. **Chromatographia** 50(5-6) (1999) 325-332.
- [280] Medina-Hernandez M.J., Sagrado S. *Chromatographic quantification of hydrophobicity using micellar mobile phases*. **J. Chromatogr. A** 718(2) (1995) 273-282.
- [281] García Alvarez-Coque M.C., Torres Lapasió J.R. *Quantitation of hydrophobicity in micellar liquid chromatography*. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** 18(8) (1999) 533-543.
- [282] Khaledi M.G., Peuler E., Ngeh-Ngwainbi J. *Retention behavior of homologous series in reversed-phase liquid chromatography using micellar, hydro-organic, and hybrid mobile phases*. **Anal. Chem.** 59(23) (1987) 2738-2747.
- [283] Khaledi M.G. *Hydrophobic selectivity in micellar and hydro-organic reversed-phase liquid chromatography*. **Analytical Chemistry** ® 60(9) (1988) 876-887.
- [284] 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.