

фактор и опасность принятия субъективно-го решения о качестве. Погрешности такой экстраполяции трудно оценить. Требования к пригодности калибровки достаточно жесткие, и вызывает сомнение сама возможность их выполнения при калибровке графическим методом. В то же время именно правильность калибровки в основном и определяет правильность результатов анализа.

Калибровка с использованием программного обеспечения. Используемая ЕФ калибровочная кривая (2) была довольно произвольно впервые предложена еще в 1974 году [15]. Она достаточно сложна (причины этой сложности не совсем понятны, поскольку любую кривую можно описать полиномом) и требует для оптимизации применения нелинейных итерационных процедур, которые осложняются еще и тем, что критериев оптимизации не один, а два (см. выше). Это не позволяет прямо применить, например, обычно используемый метод наименьших квадратов (пусть даже и в нелинейном варианте). Поэтому некоторые фирмы [2, 4, 5] используют упрощенные зависимости. Так, предполагая в (2)

$$b_5 \ll e^{(b_4 + b_1 \cdot K_i + b_2 \cdot K_i^2 + b_3 \cdot K_i^3)} \quad (4)$$

и проводя логарифмирование, получим 4-параметрическое уравнение:

$$\log M_i = b_4 + b_1 \cdot K_i + b_2 \cdot K_i^2 + b_3 \cdot K_i^3. \quad (5)$$

Из уравнения (1) видно, что использование коэффициентов распределения K_i преследует две цели:

1) приведение объемов (или времен) удерживания к единому масштабу – нормирование их на единицу (что является особенно актуальным при ручной оптимизации);

2) компенсация неизбежных колебаний величин удерживания между различными сериями опытов на одной и той же колонке (например, за счет температурных факторов – см. п. 2.1.3).

В том случае, когда имеется очень хорошая воспроизводимость величин удерживания в разных сериях опытов и в разные дни, при компьютерной оптимизации вместо коэффициентов распределения K_i можно использовать просто сами величины удерживания (например, времена удерживания t_i). Можно показать, что уравнение (5) приобретает при этом вид:

$$\log M_i = b_4 + b_1 \cdot t_i + b_2 \cdot t_i^2 + b_3 \cdot t_i^3. \quad (6)$$

Именно такое уравнение используют некоторые фирмы вместо принятого в ЕФ уравнения (2) [2, 4, 5]. Функции (5-6) значительно проще поддаются оптимизации (в правой части полином, для которого вполне применим линейный взвешенный метод наименьших квадратов), да и число параметров (b_i) здесь не пять, а четыре. Однако справедливость неравенства (4) вызывает сомнения, особенно для малых молекулярных масс и малых M_i .

Что же касается правомерности использования времен удерживания t_i вместо коэффициентов распределения K_i , то это, как показано выше (см. п. 2.1.3), может привести к существенным погрешностям. Использование уравнения (6) возможно для какого-то конкретного хроматографа в хорошо кондиционированной комнате в течение достаточно узкого промежутка времени, поскольку в процессе старения колонки происходит также и изменение величин t_i даже при соблюдении всех условий анализа. Рекомендовать же такой подход (уравнение (6)) для внесения в АНД вряд ли возможно.

Кроме того, применение 4-параметрических уравнений (5-6) вместо 5-параметрического уравнения (2) ЕФ неизбежно ухудшает калибровку. Насколько это ухудшение допустимо, оценить достаточно трудно. Сами калибровочные стандарты могут вполне удовлетворять критериям пригодности калибровки по отклонению от кривой (6) (тем более, что критерии эти для декстранов достаточно либеральны). Однако это еще не означает, что для декстрана, имеющего среднюю молекулярную массу между стандартами, кривая (6) даст результат, согласующийся с уравнением (2) ЕФ. Поэтому применение соотношений (5-6) вместо (2) требует серьезного экспериментального подтверждения сопоставимости полученных результатов с ЕФ.

3.3. Калибровочные стандарты и их количество

Уравнения (2-3) можно представить в виде:

$$\overline{M}_w(j) = F(K_{ij}, b_k), \quad (7)$$

где:

F – некая функция (вид которой в данном случае не важен), индекс j указывает на стандарт, i – на сектор хроматограммы, k – на номер параметра.