

Экспериментальные коэффициенты K_{ij} выступают как численные коэффициенты уравнений (7). Неизвестными же величинами являются параметры b_k , которые надо найти, минимизируя (см. п. 1.2) отклонения рассчитанных величин средних молекулярных масс стандартов $\overline{M}_w(j)$ от их паспортных значений. Таким образом, мы имеем систему 6 уравнений (5 стандартов декстранов + глюкоза) с 5 неизвестными (величины b_1, b_2, b_3, b_4 и b_5).

Так как система уравнений (7) (и, соответственно, (2-3)) является 5-параметрической, то число ее степеней свободы при оптимизации равно $\nu = 6 - 5 = 1$. Учитывая, что двусторонний коэффициент Стьюдента для 95 % вероятности и $\nu = 1$ равен 12.7 [16], говорить о какой-либо статистической надежности калибровки ЕФ не приходится. Поэтому ведущие фирмы-производители для повышения надежности калибровки стараются увеличить число калибровочных стандартов. Так, вместо 5 стандартов у ЕФ, фирма «Фармакосмос» (Дания) использует 10 [11], а фирма «Биотика» - 8 (без 670 000 и 150 000) стандартов декстранов со средними молекулярными массами 670 000 у.е., 410 000 у.е., 270 000 у.е., 150 000 у.е., 80 000 у.е., 50 000 у.е., 25 000 у.е., 12 000 у.е., 5 000 у.е., 1 000 у.е. [2, 4, 5].

Следует отметить, что уравнение (2) ЕФ предлагает для диапазона молекулярных масс от 4 000 у.е. до 250 000 у.е. Использование его для более широких диапазонов (например, 1 000 – 670 000 у.е.) требует специального обоснования. Одной из причин этого является то, что *EP CRS декстран* V_o , используемый в качестве маркера нулевого объема, имеет конечную среднюю молекулярную массу. В ЕФ эта масса не указывается, но она достаточна для указанного в ЕФ диапазона (от 4 000 у.е. до 250 000 у.е.). Расширение диапазона в сторону более высоких масс декстранов уменьшает точность анализа. Поэтому целесообразно увеличивать число стандартов в диапазоне, близком к «европейскому», например: 270 000 у.е., 150 000 у.е., 80 000 у.е., 50 000 у.е., 25 000 у.е., 12 000 у.е., 5 000 у.е.

3.4. Критерии оптимизации калибровки

Как видно из п. 1.3, ЕФ использует разный набор критериев для ручной и компьютерной оптимизации, что связано со спецификой ручной оптимизации, при которой трудно оптимизировать молекулярную массу для глюкозы в столь узких пределах (178-182 у.е.). Поэтому результаты ручной и компьютерной

оптимизации, вообще говоря, приводят к разным калибровочным кривым. ЕФ считает, что такие различия допустимы.

Кроме того, в обоих случаях при оптимизации применяется набор из двух разных критериев (ручная калибровка: отклонение по каждому из стандартов декстранов $\leq 5\%$ и среднее отклонение $\leq \pm 3\%$; компьютерная калибровка: отклонение по каждому из стандартов декстранов $\leq 5\%$ и отклонение по глюкозе не более 2 у.е.).

Такой сложный набор критериев затрудняет оптимизацию калибровки и делает ее неоднозначной, поэтому предпринимаются попытки ее упростить.

Так, некоторые фирмы вначале находят по уравнению (6) коэффициенты b_i , используя паспортные ориентировочные значения молекулярных масс стандартов в максимумах пиков (M_p), а затем варьирует их, добиваясь соответствия рассчитанных средней молекулярной (M_w) и средней числовой молекулярной масс (M_n) стандарта декстрана 50 с паспортными значениями на уровне не более 0.5 % [2, 4]. Поскольку при этом для других стандартов никаких требований к соответствию рассчитанных молекулярных масс паспортным значениям не предъявляется, то данный подход не соответствует ЕФ. Кроме того, говорить о количестве степеней свободы при такой оптимизации калибровочной кривой (даже 4-параметрической) в этом случае вообще нельзя (оно отрицательно: $\nu = 1 - 4 = -3$). Соответственно, трудно судить о какой-либо статистической достоверности получаемых результатов и однозначности проведенной оптимизации. Данный подход может быть вполне оправданным и давать хорошие результаты при жестко регламентированном внутривзаводском контроле, но корректность его использования в других лабораториях (работающих только по требованиям ЕФ) вызывает большие сомнения, особенно учитывая использование уравнения (6) вместо (2) и допустимые колебания температуры хроматографического помещения (см. п. 2.1.3).

Неясным в ЕФ является и выражение «среднее значение всех отклонений не должно превышать $\pm 3\%$ ». Имеется в виду алгебраическое среднее или среднее значение модулей отклонений? Судя по знаку ($\pm 3\%$), имеется в виду именно алгебраическое среднее, но по смыслу правильнее брать среднее значение модулей отклонений, поскольку в