

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

**Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Факультет естественных наук**

Кафедра: аналитическая химия

Дипломная работа

**ОПТИМИЗАЦИЯ СТРАТЕГИИ СРАВНИТЕЛЬНОГО
АНАЛИЗА ОБРАЗЦОВ СЛОЖНОГО СОСТАВА
МЕТОДОМ ВЭЖХ-УФ**

Чернова Алена Александровна

Научный руководитель
к.х.н. Кожанова Людмила Алексеевна

Новосибирск – 2011

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	4
2. Обзор литературы	5
2.1. Выбор и описание объектов исследования – образцов сложного состава	5
2.2. Оптимизация условий экстракции образцов сложного состава для получения "отпечатков пальцев"	7
2.3. Оптимизация хроматографических условий получения "отпечатков пальцев"	8
2.4. Критерии оптимизации для хроматографических "отпечатков пальцев"	12
2.4.1. Сумма разрешений	12
2.4.2. Нормализованный фактор разрешения	12
2.4.3. Информационное содержание	12
2.4.4. Иерархическая хроматографическая функция ответа	13
2.5. Валидация методики получения "отпечатков пальцев"	13
2.6. Выбор математических методов сравнения "отпечатков пальцев". Исследование их возможностей и ограничений	13
2.6.1. Коэффициенты связи	14
2.6.2. Меры расстояния	15
2.6.3. Методы проверки статистических гипотез	16
2.6.4. Методы классификации	17
2.6.5. Методы кластеризации	18
3. Экспериментальная часть	22
3.1. Материалы	22
3.2. Оборудование	23
3.3. Приготовление растворов	24
4. Результаты и обсуждение	25
4.1. Анализ зеленого чая	25
4.1.1. Определение влажности различных сортов зеленого чая	25
4.1.2. Выбор оптимальных условий хроматографического анализа	25
4.1.3. Идентификация основных хроматографических пиков	27
4.1.4. Выбор оптимальных условий экстракции	28
4.1.5. Оценка метрологических характеристик методики определения компонентов чая (повторяемости и внутрилабораторной прецизионности)	30
4.1.6. Сравнение часто применяемых методов оценки сходства и различия хроматографических "отпечатков пальцев" на примере зеленого чая	31
4.1.7. Применение t-критерия Стьюдента для проверки стабильности образцов и	

сравнения разных партий образцов	35
4.2. Анализ лекарственного препарата корвалола	37
4.2.1. Выбор оптимальных условий хроматографического анализа	37
4.2.2. Оценка метрологических характеристик методики определения компонентов корвалола (повторяемости и внутрилабораторной прецизионности)	39
4.2.3. Применение t-критерия Стьюдента для сравнения разных образцов корвалола	40
4.3. Анализ молотого кофе	41
4.3.1. Выбор оптимальных условий хроматографического анализа	41
4.3.2. Оценка метрологических характеристик методики определения компонентов молотого кофе (повторяемости и внутрилабораторной прецизионности)	43
4.3.3. Применение t-критерия Стьюдента для сравнения разных образцов молотого кофе	44
5. Выводы	46
6. Список литературы	47

1. ВВЕДЕНИЕ

В последнее время во всем мире возникают задачи сравнения образцов сложного состава, чаще всего это многокомпонентные объекты растительного происхождения. Как правило, их полный компонентный состав неизвестен, а биологическая активность обусловлена не только действием нескольких активных компонентов, но и синергетическими эффектами. Поэтому задача подтверждения подлинности и оценки стабильности таких объектов является особенно актуальной.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) - один из лучших методов для количественного анализа сложных образцов с одинаковым или близким качественным составом, а также для оценки степени их сходства и различия. В задачах такого рода разным образцам соответствуют хроматограммы с фиксированным временем выхода большинства компонентов, а различия в образцах проявляются в колебаниях соотношений площадей пиков отдельных компонентов. Каждая хроматограмма представляет собой "отпечаток пальца". "Отпечаток пальца" — широкий термин. Хроматографический "отпечаток пальца", как правило, состоит из площадей пиков выбранных компонентов на хроматограммах многокомпонентных образцов. До настоящего времени сходство и различие хроматографических "отпечатков пальцев" часто оценивалось путем визуальной экспертной оценки хроматограмм опытными химиками-аналитиками, однако для целей регулирования и документирования необходима объективная количественная оценка сходства и различия "отпечатков пальцев". Это необходимо также для создания баз данных сложных образцов.

В последние годы активно обсуждаются новые подходы к развитию концепции "отпечатка пальца" для характеристики образцов сложного состава. Современный подход предполагает использование для этих целей широкого арсенала различных хемометрических методов. Хемометрия — это применение математических и статистических методов для извлечения максимальной информации из химических данных.

Целью настоящей работы является разработка общей стратегии сравнения сложных образцов методом ВЭЖХ-УФ: оптимизация способа подготовки проб, получение информативных хроматографических "отпечатков пальцев", оценка метрологических характеристик методики получения "отпечатков пальцев", выбор подходящего метода количественной оценки сходства и различия образцов.

Все результаты, представленные в настоящей работе, получены непосредственно автором. Автор самостоятельно проводил все эксперименты и обрабатывал данные, а также принимал активное участие в планировании экспериментов и обсуждении результатов.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Выбор и описание объектов исследования - образцов сложного состава

Извлечение необходимой информации из многокомпонентных образцов является сложной задачей для химиков-аналитиков. В наши дни в качестве таких объектов чаще всего выступают растительные объекты. Широкое распространение получили лекарственные средства на их основе - объекты традиционной китайской медицины (ТСМ). Сейчас их качество часто оценивается по одному или нескольким веществам-маркерам. В 1990-х в Китайской фармакопее были документированы вещества-маркеры в 100 травах. Тем не менее, метод маркеров не позволяет достоверно оценить сложную многокомпонентную систему. Химический состав многокомпонентных объектов, а следовательно и биологическая активность, может изменяться в зависимости от многих факторов, а именно: генетических, экологических, сельскохозяйственных, а также способов обработки и приготовления образцов. Поэтому необходимо определять большое число компонентов для гарантии надежности и воспроизводимости фармакологических свойств и улучшения контроля качества. В связи с этим Государственное Управление по Контролю за Продуктами и Лекарствами Китая предложило использовать метод "отпечатка пальцев" в качестве метода контроля качества растительных объектов и стадий его подготовки. "Отпечатки пальцев" могут быть получены с помощью различных методов: ВЭЖХ, газовой хроматографии (ГХ), тонкослойной хроматографии (ТСХ) и капиллярного электрофореза (КЭ) [1,2].

В качестве моделей сложных многокомпонентных объектов мы выбрали зеленый чай, молотый кофе и лекарственный препарат корвалол.

Чай — это продукт, который получается после довольно сложного процесса обработки листьев и почек, собираемых с чайного дерева или куста. В зависимости от того, какие процедуры использовались при обработке, чай относится к одной из следующих групп: неферментированный (зеленый), частично ферментированный (оолонг) и полностью ферментированный (черный) чай. Чай состоит на 30-50% из растворимых в воде соединений, положительно влияющих на его качество: фенольные соединения (танин, катехины, флавоновые и антоциановые гликозиды, фенолкарбоновые кислоты), эфирные масла и альдегиды, кофеин, витамины, ферменты, микро- и макроэлементы и др. Чем больше экстрактивных веществ содержится в чайном листе, тем выше его качество [3].

Основные антиоксиданты зеленого чая, определяющие его биологическую ценность, относятся к классу катехинов. Катехинам присуща высокая биологическая активность, обусловленная присутствием в молекуле активных фенольных гидроксильных

и карбонильных групп, которые подвергаются различным биохимическим изменениям, принимают участие в ряде физиологических процессов и обладают широким спектром фармакологической активности. Катехины оказывают мочегонное, антимикробное, противовоспалительное, противоопухолевое действие и обладают Р-витаминной активностью [4]. Содержание катехинов меняется в зависимости от сорта чайного листа, времени его сбора, степени ферментативной обработки и других факторов.

Чайный лист содержит 7 основных катехинов: 4 простых — (±) катехин (C) и (-) эпикатехин (EC), (±) галлокатехин (GC), (-) эпигаллокатехин (EGC); 3 сложных галлированных катехина: (-) эпикатехингаллат (ECG), (-) эпигаллокатехингаллат (EGCG) и (±) галлокатехингаллат (GCG). На рис. 1 показаны структурные формулы основных компонентов зеленого чая.

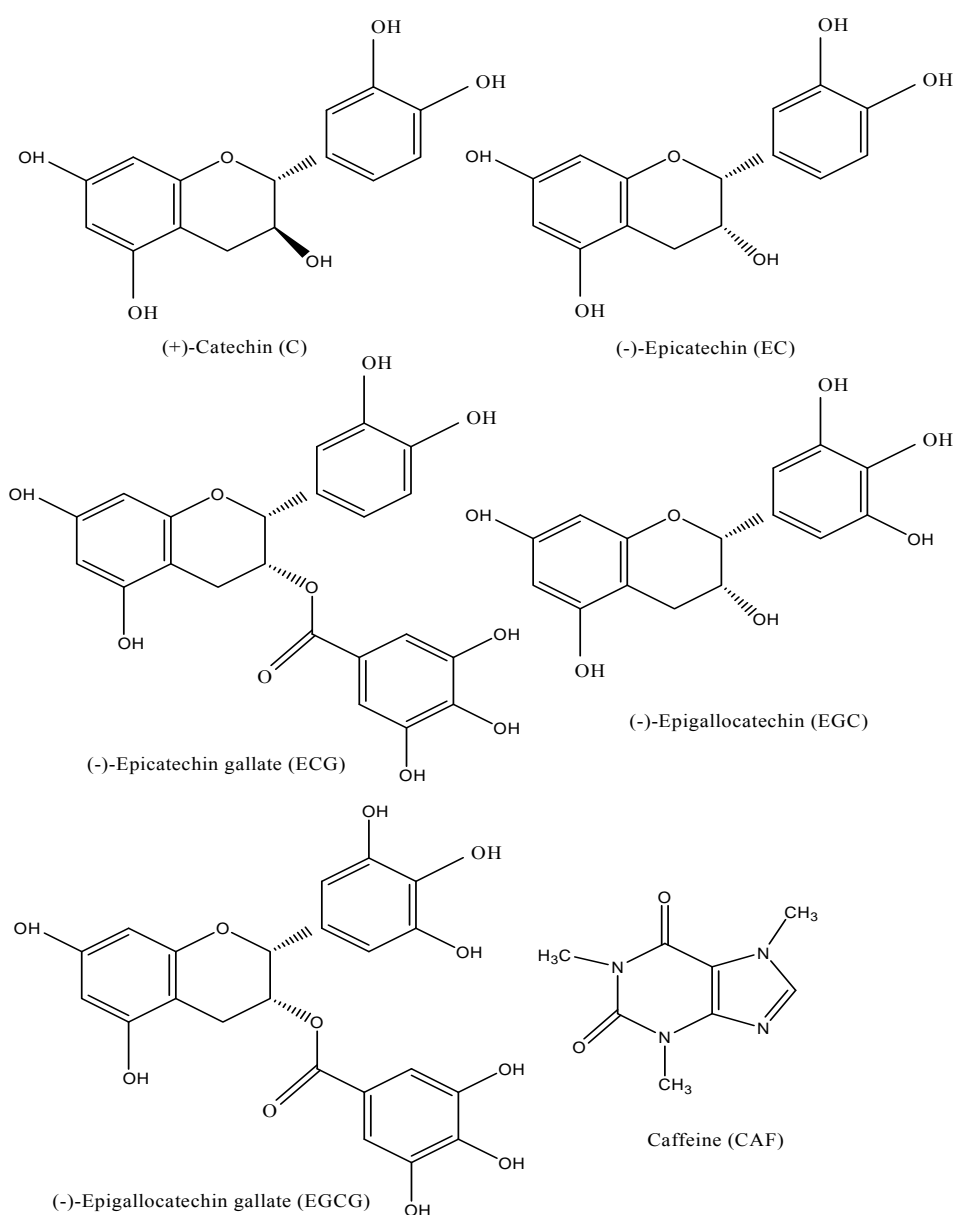


Рис. 1. Структурные формулы катехинов и кофеина.

Кофе — напиток, изготавливаемый из жареных зёрен кофейного дерева.

Благодаря содержанию кофеина он оказывает стимулирующее действие. В кофе содержание кофеина составляет до 1500 мг/л. Пуриновые алкалоиды (кофеин, теобромин и теофиллин) при систематическом употреблении их на уровне 1000 мг в день вызывают у человека постоянную потребность в них, напоминающую алкогольную зависимость. Кофе оказывает сильное диуретическое (мочегонное) действие, повышает артериальное давление, влияет на функционирование ЦНС. Кофе кратковременно улучшает внимание, улучшает способность концентрироваться, особенно, когда человек утомлён.

С помощью смешивания сортов получают кофе с дополняющими друг друга свойствами. Таким образом, получается сбалансированный продукт, в котором усилены такие желательные качества, как приятный вкус, аромат, насыщенность и привлекательный внешний вид. В зависимости от того, проявления каких соединений хочет добиться производитель, подбирается оптимальный режим обжарки. Обжаренные зёрна затем измельчают в кофемолке. Вкус кофе формируется благодаря многим сложным ароматическим химическим соединениям [5].

Корвалол — комбинированный препарат, содержащий этиловый эфир α -бромизовалериановой кислоты (около 2 %), фенобарбитал (1,82 %), едкий натр (около 0,3 %), масло мяты перечной (0,14 %), смесь спирта этилового 96 % и воды дистиллированной до 100 %.

Входящий в состав корвалола этиловый эфир α -бромизовалериановой кислоты является седативным и спазмолитическим средством, действующим подобно экстракту валерианы; в больших дозах оказывает также легкое снотворное действие. Фенобарбитал натрия оказывает легкое седативное и сосудорасширяющее действие без заметного снотворного эффекта. Мятное масло оказывает рефлекторный сосудорасширяющий и спазмолитический эффект.

Применяют корвалол при неврозах с повышенной раздражительностью, не резко выраженных спазмах коронарных сосудов, тахикардии, бессоннице; в ранних стадиях гипертонической болезни, при спазмах кишечника [6].

Все эти объекты имеют сложный многокомпонентный состав и удобны для получения хроматографических "отпечатков пальцев".

2.2. Оптимизация условий экстракции образцов сложного состава для получения "отпечатков пальцев"

Для того чтобы исследовать сложные объекты современными аналитическими методами, необходимо произвести извлечение (экстракцию) целевых компонентов из

образца. Метод экстракции нуждается в оптимизации. Он должен быть прост в исполнении, иметь хорошую воспроизводимость и адекватную селективность. Метод извлечения должен быть оптимизирован по следующим параметрам [7]:

1. состав экстрагента;
2. соотношение вещества и растворителя;
3. степень измельчения образца;
4. время экстракции;
5. температура экстракции [8,9].

Для сокращения числа экспериментов при оптимизации метода экстракции можно использовать метод экспериментального дизайна [10].

2.3. Оптимизация хроматографических условий получения "отпечатков пальцев"

Основными аналитическими методами для анализа многокомпонентных образцов в настоящее время являются жидкостная хроматография, газовая хроматография с масс-спектроскопическим детектированием, тонкослойная хроматография и капиллярный электрофорез [11].

Жидкостная хроматография имеет преимущества перед остальными методами: она удобна в использовании, позволяет анализировать как полярные, так и неполярные соединения, не имеет ограничений по летучести и стабильности соединений. Важным преимуществом является возможность многоканального детектирования [4,12].

Метод ВЭЖХ основан на разделении веществ за счёт их различного физического и химического взаимодействия с хроматографической системой (неподвижная фаза и элюент). Основной неподвижной фазой в ВЭЖХ является силикагель. Он применяется и как таковой, и как носитель химически привитых фаз. Использование химически привитых неподвижных фаз расширяет возможности ВЭЖХ, делая её пригодной для разделения водорастворимых соединений. В настоящее время около 90% всех анализов методом ВЭЖХ выполняют на химически привитых фазах, главным образом фазах с привитыми алкильными группами (обращенных фазах, далее ОФ). В этом случае неподвижная фаза неполярна, а подвижная - полярна.

ОФ могут отличаться друг от друга характеристиками матрицы - силикагеля - и строением привитого радикала. К основным характеристикам силикагеля относятся: размер зерна (от 3 до 20 мкм), форма зерна (сферическая или неправильная), размер пор зерна (от 5 до 50 нм), удельная поверхность (от 10 до 600 м²/г). Наибольшее распространение получила обращенная фаза C18. Её используют для разделения как неполярных (например, эфиров жирных кислот), так и водорастворимых соединений.

Выбор элюента, как правило, в более значительной степени влияет на разделение, чем выбор неподвижной фазы. Чем прочнее элюент адсорбируется на неподвижной фазе, тем больше его элюирующая способность. Молекулы элюента и растворённые в нём соединения конкурируют за место на поверхности неподвижной фазы. В ОФ ВЭЖХ элюирующая сила растворителей возрастает с уменьшением их полярности. Элюотропный ряд, в котором растворители располагаются в порядке возрастания их элюирующей силы, выглядит следующим образом: вода - метанол - ацетонитрил - этанол - диоксан - тетрагидрофуран - 2-пропанол - 1-пропанол.

Для извлечения максимальной информации из хроматографического "отпечатка пальца" необходимо получить наилучшее разделение. Для этого необходимо выбрать подходящие:

1. неподвижную фазу (НФ);
2. температуру колонки;
3. состав подвижной фазы (ПФ);
4. форму градиента;
5. скорость подачи элюентов;
6. время хроматографического анализа;
7. длины волн детектирования [13].

В работах [14-18] авторы оптимизировали хроматографические условия для получения наиболее информативных хроматограмм образцов зеленого чая.

Авторы работы [14] подбирали наилучшие условия разделения компонентов зеленого чая в изократическом и градиентном режимах хроматографирования. Использовали колонку Optimapark OP C18 (250x4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм), регистрацию оптической плотности проводили на 280 нм. Оптимальное разделение смеси флавоноидов получили в градиентном режиме элюирования.

Другие авторы [15] использовали хроматограф Merck Hitachi L600 с УФ детектированием на 278 нм, колонки Intersil-ODS-2 (GL Sciences Inc.) (150x4,0 мм, диаметр частиц 5 мкм) и Opti-Guard PR C18 Violet. В качестве элюентов использовали фосфатный буфер и ацетонитрил в градиентном режиме элюирования.

В работе [16] использовалась колонка Wakosil-II 5C18 HG (3,0x150 мм) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan), оборудованная защитной предколонкой Mightysil RP18GP (2,0x5 mm) (Kanto Kagaku, Japan) и элюенты сложного состава: вода/метанол/фосфорная кислота (85/15/0,1) (элюент А); вода/метанол/этилацетат/фосфорная кислота (85/15/1/0,1) (элюент Б), элюирование проводили в градиентном режиме. В этих условиях удалось успешно разделить 16 фенольных соединений и кофеин.

В работе [17] подбирали наилучшие градиентный режим элюирования и колонку с привитой фазой. Исследовали шесть колонок с различными привитыми фазами в двух градиентных режимах. Авторы пришли к заключению, что присутствие трифторуксусной кислоты является существенным для разделения катехинов. Наилучшие результаты получены при использовании дезактивированных мономерных колонок C18, что значительно улучшает хроматографическое разделение не только флавоноидов, но и других классов соединений в чае. Было показано, что наилучшее разделение наблюдается при использовании колонки Zorbax Eclipse XDB-C18 (Rockland Technologies Inc. /Dupont).

Авторы работы [18] использовали хроматограф Agilent 1100 и колонку TSKgel ODS-100Z (150×4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм, Tosoh). Элюенты: А – муравьиная кислота (рН=2,5); Б - метанол. Градиентный режим элюирования. Регистрацию поглощения вели в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм. Предложенный метод имеет хорошую чувствительность и воспроизводимость, время проведения ВЭЖХ анализа 15 мин. Качество получаемых хроматограмм позволяет использовать данную методику для оценки различий в разных образцах чая.

Авторы работ [11,19-23] оптимизировали хроматографические условия для получения "отпечатков пальцев" многокомпонентных растительных образцов, применяемых в ТСМ.

Авторы [11] получали "отпечатки пальцев" одного из сортов папоротника, который используется в народной медицине для снижения высокой температуры, активизации кровообращения, устранения застоев. Недавние исследования выяснили, что в одном из 12000 сортов папоротников *Thelypteridaceae*, содержится флавоноид protoapigenone, используемый в качестве антиопухолевого агента. Для анализа использовали хроматограф Hitachi (Japan) с УФ детектором L-2400, колонку Burospher-100 C18 (250×4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм, Knauer, Berlin Germany). Элюенты: фосфорная кислота (рН = 3) и ацетонитрил. Градиентный режим элюирования. Детектирование проводили на 210 нм.

Авторы [19] получали "отпечатки пальцев" для *Paria cocos*, который используется в ТСМ как антиопухолевое и повышающее иммунитет средство. Использовали хроматограф Agilent 1100 с диодной матрицей в качестве детектора, колонку Hypersil ODS (250×4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм). Элюенты: фосфорная кислота и ацетонитрил. Градиентный режим элюирования. Детектирование проводили на 210 и 242 нм.

Авторы [20] сравнивали "отпечатки пальцев" шафрана из 15 регионов Китая. Шафран используется в ТСМ как противоангинное средство, его главный активный метаболит *cronins* может приостанавливать рост опухолевых клеток. Использовали хроматограф Agilent 1200 с диодной матрицей в качестве детектора, колонку Zorbax SB-

C18 (250x4,6 мм, 5 мкм) с предколонкой Phenomenex C-18 (10x4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм). Элюенты: уксусная кислота и метанол. Градиентный режим элюирования. Детектирование проводили на 310 и 440 нм.

Авторы [21] использовали хроматографические "отпечатки пальцев" для контроля качества *Cirsium setosum* (бодяга щетинистая). Одновременно определяли шесть фенольных соединений в 11 образцах из разных местностей Китая. Анализ проводили на хроматографе Agilent 1100 с диодной матрицей в качестве детектора, колонке Eclipse C-18 (250x4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм) с предколонкой (12.5x4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм). Элюенты: уксусная кислота и ацетонитрил. Градиентный режим элюирования. Детектирование проводили на 326 нм.

Авторы [22] получали "отпечатки пальцев" *Andrographis paniculata*, который в течение многих столетий использовался в Китае и Индии в качестве лекарства от гриппа и инфекций дыхательных путей. Является анальгетиком, жаропонижающим, противоопухолевым, антибактериальным, противовирусным средством. Терапевтическая активность связана с присутствием в этом растении *diterpene andrographolide* (1) и *neoandrographolide* (2). Первый является ингибитором против ВИЧ, второе вещество лучшее в борьбе с малярией. Использовали хроматограф Shimadzu LC-8A с диодной матрицей в качестве детектора, колонку Merck PR18e (100x4,6 мм). Поскольку для извлечения применялись различные экстрагенты, то для каждого из них использовались свои ПФ: для гексана, хлороформа и метанола – ацетонитрил:вода 50:50 (об./об.); для водных экстрактов – ацетонитрил:вода 25:75 (об./об.). Градиентный режим элюирования. Детектирование проводили на 220 нм.

Авторы [23] получали "отпечатки пальцев" *Euonymus alatus (Thunb) siebold* на ЖХ Shimadzu с диодной матрицей в качестве детектора. Колонка Shim C₁₈ (150x4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм) и предколонка Kromasil C₁₈ (10x4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм). Элюенты: уксусная кислота и метанол. Градиентный режим элюирования. Детектирование проводили на 360 нм.

Данные по выбору условий получения хроматографических "отпечатков пальцев" для кофе и корвалола в литературе отсутствуют.

Обзор литературы по получению хроматографических "отпечатков пальцев" многокомпонентных образцов показывает, что чаще всего авторы используют колонки с обращено-фазовым сорбентом. В качестве элюента "А" используют водные растворы кислот, в качестве элюента "Б" - метанол или ацетонитрил, градиентный режим элюирования. Детектирование проводят в диапазоне 200-600 нм в зависимости от типа образца.

2.4. Критерии оптимизации для хроматографических "отпечатков пальцев"

Важный аспект при оптимизации условий получения хроматографических "отпечатков пальцев" – это выбор подходящего критерия для оценки качества полученных "отпечатков пальцев". Чаще всего используются следующие критерии: сумма разрешений хроматографических пиков ($\sum R_S$), нормализованный фактор разрешения (r), информационное содержание (Φ) и иерархическая хроматографическая функция ответа (HCRF) [10].

2.4.1. Сумма разрешений

Сумма разрешений между соседними пиками обычно используется для оценки общей пиковой ёмкости колонки.

Пиковая ёмкость колонки – это удобный параметр для сравнения эффективности разделения на различных колонках в градиентном режиме хроматографирования. Она показывает, какое число хроматографических пиков, равномерно распределенных по времени хроматограммы, начиная от свободного объема колонки, можно разделить с разрешением равным единице в данных хроматографических условиях [24].

2.4.2. Нормализованный фактор разрешения

Нормализованный фактор разрешения определяется по формуле:

$$r = \prod_{i=2}^{n-1} \left(\frac{R_{i,i+1}}{\bar{R}_S} \right), \quad (1)$$

где $R_{i,i+1}$ разрешение между двумя соседними пиками и \bar{R}_S среднее разрешение. Этот фактор характеризует равномерность распределения пиков по времени хроматограммы.

2.4.3. Информационное содержание

Для оценки степени перекрытия пиков на хроматограмме вводят понятие информационного содержания. Хроматографический "отпечаток пальца" это многомерная система, содержащая в своем составе большое количество пиков, которые могут перекрываться друг другом. Фактически хроматографический "отпечаток пальца" является кривой распределения нескольких пиков и может быть расценен как непрерывный сигнал, определяемый формой и величиной хроматографических пиков. Информационное содержание непрерывного сигнала может быть выражено следующей формулой:

$$\Phi = - \sum p_i \log p_i, \quad (2)$$

где p_i – это значение вероятности. Принято, что $\sum p_i = 1$. Основываясь на этом, информационное содержание (Φ) для хроматографического "отпечатка пальца" можно вычислить следующим образом:

$$\Phi = - \sum \left(\frac{x_i}{\sum x_i} \lg \left(\frac{x_i}{\sum x_i} \right) \right), \quad (3)$$

где x_i хроматографический ответ компонентов (высота или площадь пиков). Максимальное значение Φ соответствует наилучшему разделению пиков на хроматограмме [2,25].

2.4.4. Иерархическая хроматографическая функция ответа

HCRF позволяет оценить все основные параметры оптимизации: пиковую ёмкость, минимальное разрешение и общее время анализа. Она чаще всего используется при оптимизации большого числа хроматографических условий, таких как тип колонки, температура колонки, скорость элюирования, длины волн детектирования и др. HCRF вычисляется по следующей формуле:

$$HCRF = 1,000,000n + 100,000R_{min} + (100 - t_m), \quad (4)$$

где n – число пиков, R_{min} наименьшее разрешение между двумя соседними пиками и t_m время удерживания последнего пика на хроматограмме.

Первые две-три цифры отвечают за число пиков, следующие три представляют наименьшее разрешение между пиками и последние три представляют время анализа.

Результаты, полученные по $\sum R_s$, r , Φ и HCRF не дублируют друг друга. HCRF считается наилучшим критерием, так как оценивает глобальное качество отпечатка пальца, объединяет пиковую ёмкость, разрешение и время анализа [10,13].

2.5. Валидация методики получения "отпечатков пальцев"

Перед использованием "отпечатков пальцев" для сравнения образцов необходимо провести валидацию метода получения "отпечатков пальцев". Необходимо оценить повторяемость, внутрилабораторную прецизионность, стабильность "отпечатка пальца". Повторяемость и внутрилабораторную прецизионность обычно оценивают, анализируя по шесть-десять параллельных проб исследуемого образца в один день и в разные дни. Стабильность оценивается путем анализа одного и того же образца через определенные промежутки времени. Рассчитывают относительное стандартное отклонение повторяемости и внутрилабораторной прецизионности времен удерживания и площадей пиков [10;13;23;26].

2.6. Выбор математических методов сравнения "отпечатков пальцев". Исследование их возможностей и ограничений

Большинство методов оценки степени сходства и различия образцов могут быть применены к любому типу аналитического эксперимента. Однако выбор определенного

метода оценки должен быть обоснован задачами, которые требуется решить, и пониманием возможностей того или иного математического метода [27].

Методы оценки сходства и различия в хроматографическом анализе в основном используются для решения задач установления подлинности, оценки стабильности и контроля качества образцов.

Установление подлинности сложных растительных объектов основано на определении состава, физико-химических параметров и спектральных данных для образца. На изменение состава влияют следующие факторы: генетический, экологический (почва, климат и влияние паразитов), сельскохозяйственный (культуры, урожай, удобрения), фактор обработки (хранение, добавки, преобразование в готовое изделие). Влияние всех этих факторов можно выявить с помощью математических методов [28].

Для сравнения сложных объектов наиболее часто применяют следующие подходы: "использование одного или нескольких маркеров", "многокомпонентное приближение", приближение — "вся хроматограмма как образ" [1]. Для анализа этих приближений используют разные математические методы.

Методы оценки сходства и различия можно условно разделить на сложные и простые.

Простые методы можно поделить на три группы:

- выборочные коэффициенты связи типа *корреляции* (нормированные "косинусные" меры);
- показатели *расстояния* в метрическом пространстве;
- методы проверки статистических гипотез: критерий Колмогорова-Смирнова, Q-критерий Розенбаума, U-критерий Манна-Уитни, метод максимального правдоподобия, t-критерий Стьюдента.

2.6.1. Коэффициенты связи

Стандартной мерой связи переменных является *коэффициент корреляции*. Он измеряет лишь силу линейной связи и лишь в случае, когда обе переменные числовые.

Коэффициент корреляции — это число, заключенное между -1 и 1, которое измеряет силу линейной связи двух случайных переменных. Положительное значение коэффициента корреляции означает, что с ростом одной из переменных другая также растет, с убыванием одной из переменных другая убывает. Отрицательное значение означает, что с ростом одной из переменных другая убывает, с убыванием одной из них другая растет. Коэффициент корреляции, равный нулю, означает, что между переменными отсутствует линейная связь [29]. Коэффициент корреляции вычисляется по следующей формуле:

$$r_{xy} = \frac{s_{xy}}{s_x s_y} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (5)$$

где s_{xy} – ковариация X и Y ; s_x и s_y - стандартные отклонения для наборов данных X и Y , соответственно [30].

Коэффициент корреляции имеет тот недостаток, что он отражает, главным образом, корреляцию самых больших переменных и не отражает полной картины.

Косинусные меры

Косинус угла - наиболее близкий к коэффициенту корреляции критерий [31]. Сравниваемые образцы представляются через вектора. Расчет меры близости векторов по косинусу угла, определяемого через скалярное произведение векторов, производится по формуле:

$$\cos \alpha_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^P (x_{ik} y_{jk})}{\sqrt{(\sum_{k=1}^P x_{ik}^2)(\sum_{k=1}^P y_{jk}^2)}} \quad (6)$$

где x_{ik} и y_{jk} - сравниваемые вектора, P – число пиков. Значения $\cos \alpha_{ij}$ лежат в интервале от 0 до 1, когда значение равно 1, вектора идентичны. Это непараметрический метод прост в использовании [23].

Коэффициент корреляции отличается от косинуса угла между векторами шкалой представления данных.

2.6.2. Меры расстояния

Наиболее часто для расчёта сходства и различия образцов используют расстояния Евклида и Махаланобиса.

Евклидово расстояние – это наиболее общий тип расстояния. Оно является геометрическим расстоянием в многомерном пространстве и вычисляется следующим образом:

$$d_{xy} = [\sum_i (x_i - y_i)^2]^{1/2}, \quad (7)$$

где X и Y – это наборы данных сравниваемых объектов.

Евклидово расстояние вычисляется по исходным, а не по стандартизованным данным. Это обычный способ его вычисления, который имеет определенные преимущества: например, расстояние между двумя объектами не изменяется при введении в анализ новых данных, которые могут оказаться выбросами. Его недостатком является то, что на расстояние могут сильно влиять различия между осями, по координатам которых вычисляются эти расстояния [32].

Расстояние Махаланобиса - мера расстояния между векторами случайных величин, обобщающая понятие Евклидова расстояния. Оно отличается от расстояния Евклида тем, что учитывает корреляцию между переменными и инвариантно к масштабу.

$$MD_t = \sqrt{\left(\frac{x_{11}-M_1}{\sigma_1}\right)^2 + \left[\left(\frac{x_{12}-M_2}{\sigma_2} - \rho_{12} \left(\frac{x_{11}-M_1}{\sigma_1}\right)\right) \frac{1}{\sqrt{1-\rho_{12}^2}}\right]^2}, \quad (8)$$

где x_{i1} и x_{i2} это данные из матрицы, ρ_{12} коэффициент ковариации, σ_1 и σ_2 это стандартные отклонения [33].

2.6.3. Методы проверки статистических гипотез

Критерий Колмогорова-Смирнова используется для проверки, подчиняются ли два эмпирических распределения одному закону, либо проверки, подчиняется ли полученное распределение предполагаемой модели.

Q-критерий Розенбаума — простой непараметрический критерий, используемый для оценки различий между двумя выборками по уровню какого-либо признака, измеренного количественно.

U-критерий Манна-Уитни — это статистический критерий, используемый для оценки различий между двумя выборками по уровню какого-либо признака, измеренного количественно. Позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками.

Метод максимального правдоподобия оценивает неизвестный параметр путем максимизации функции правдоподобия. Основан на предположении о том, что вся информация о статистической выборке содержится в функции правдоподобия.

Недостатком всех выше перечисленных критериев является сложность расчета и недостаточная доступность таблиц и критических значений [34].

T-критерий Стьюдента. Распределение Стьюдента – это непрерывное одномерное распределение с одним параметром – количеством степеней свободы. Форма распределения Стьюдента похожа на форму нормального распределения (чем больше число степеней свободы, тем ближе распределение к нормальному). Отличием является то, что хвосты распределения Стьюдента медленнее стремятся к нулю, чем хвосты нормального распределения [35].

С помощью критерия Стьюдента проверяются следующие статистические гипотезы:

- Сравнение случайной (нормально распределенной величины) и константы;
- Сравнение двух случайных (нормально распределенных величин).

T-критерий Стьюдента вычисляется по следующим формулам:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{(m-1)s_x^2 + (n-1)s_y^2}} \sqrt{\frac{mn(m+n-2)}{m+n}}, \quad (9)$$

где \bar{x} и \bar{y} - это средние значения измеренных величин, S_x и S_y - стандартные отклонения x и y , m и n число измерений в выборках.

при $m = n$ формула упрощается до вида:

$$t = \frac{(\bar{x} - \bar{y})}{\sqrt{\frac{S_x^2 + S_y^2}{2}}} \sqrt{n}, \quad (10)$$

Рассчитанный таким образом $|t|$ сравнивают с табличным значением t -критерия Стьюдента для выбранного уровня доверительной вероятности P (обычно $P = 0,95$) и числа степеней свободы $f = m+n-2$ для формулы (9) и $f = 2n-2$ для формулы (10), где m и n – число повторных измерений для каждого образца.

К сложным методам оценки сходства и различия можно отнести следующие: метод k ближайших соседей, линейный дискриминантный анализ, метод деревьев решений, метод опорных векторов, кросс-проверка, наивно-байесовский подход, метод принципиального компонентного анализа (PCA) и др. [28,36,37]. Сложные методы делятся на методы классификации и методы кластеризации. Методы классификации предполагают отнесение данных к тому или иному известному классу, методы кластеризации имеющиеся данные делят на классы.

2.6.4. Методы классификации

Линейный дискриминантный анализ – наиболее часто используемый метод классификации. Он основан на определении линейных дискриминантных функций, которые максимизируют отношение различия между классами и минимизируют отношение различий в пределах класса.

Метод деревьев решений – популярный метод классификации и прогнозирования. Способ создания иерархической последовательной структуры. Основа такой структуры – ответы "да" или "нет" на ряд вопросов.

Метод опорных векторов определяет классы при помощи границ областей. Решаются задачи бинарной классификации. В основе метода лежит понятие плоскостей решений. Плоскость решения разделяет объекты с разной классовой принадлежностью.

Современный метод, использующий в своей основе расстояние Махаланобиса - CAIMAN [38,39]. Классификация и анализ матрицы влияния (CAIMAN) новый метод классификации, основанный на матрице влияния. В зависимости от целей CAIMAN может использоваться в трех схемах: (1) D-CAIMAN дискриминантный метод классификации; (2) M-CAIMAN метод моделирования класса, позволяет образец классифицировать, не классифицировать вообще или отнести к нескольким классам; (3) A-CAIMAN рассматривает ассиметричные случаи, когда только справочный класс смоделирован [40,41].

2.6.5. Методы кластеризации

Метод k ближайших соседей основан на хранении данных в памяти для сравнения с новыми элементами. При появлении новой записи для прогнозирования находятся отклонения между этой записью и подобными наборами данных, и наиболее подобная запись (или ближайший сосед) идентифицируется.

Кросс-проверка – метод получения оценок неизвестных параметров модели. Основная идея этого метода - разделение выборки данных на "v складки". "V складки" – это случайным образом выделенные изолированные подвыборки. Использует метод k ближайших соседей.

Наивно-байесовский подход – исходит из предположения о взаимной независимости признаков. Использует все переменные и определяет все зависимости между собой. Применяется для фильтрации спама.

Отдельное место занимает метод принципиального компонентного анализа (PCA). Он наиболее часто используется для оценки сходства и различия. Его часто бесосновательно используют как метод классификации. PCA максимизирует различие в данных, но основное различие не обязательно связано с изучаемым эффектом [28].

При сравнении хроматограмм метод PCA используется для решения задач установления различий между отдельными образцами по принципу "более сходен – менее сходен" [42]. Метод, основан на векторном представлении хроматограмм [37]. Каждая хроматограмма отображается вектором из начала координат в n -мерном пространстве, где n – общее число учитываемых пиков в серии хроматограмм. Каждому пику на хроматограмме соответствует своя ось, а координаты конца векторов по каждой из осей задаются площадями соответствующих пиков. При этом хроматограммам, различающимся лишь количеством вещества в пробе, соответствуют равнонаправленные векторы, модули (длины) которых пропорциональны количеству вещества.

Степень подобия хроматограмм двух образцов можно выразить углом α между их векторами (у идентичных образцов $\alpha = 0$). Угол между векторами находится по формуле:

$$\alpha, \text{град} = (180^\circ / 3,14159 \dots) \times \arccos \left[\frac{\sum M_i L_i}{(\sum M_i^2 \sum L_i^2)^{1/2}} \right], \quad (11)$$

где M_i , L_i – площади пиков i – вещества в хроматограммах M и L . Расчет угла α может быть выполнен и для неполного набора пиков – исключительно удобный факт, широко используемый практически. Ясно, что векторы, соответствующие повторным измерениям, вследствие случайных ошибок при приготовлении проб, интегрировании хроматограмм и по другим причинам могут различаться по длине (количество образца в пробе) и по направлению. При этом пучок векторов окажется внутри конуса с вершиной в начале

координат. Образцы принимаются неидентичными, если соответствующие конусы не пересекаются.

SIMCA – наиболее часто используемый метод, разносящий образцы на классы. Этот метод использует в своей основе PCA [36].

Сложные методы обладают множеством преимуществ перед простыми, однако требуют специального программного обеспечения и часто неприменимы к данной задаче. Для решения простых задач лучше использовать простые методы [1].

Для сравнения хроматографических "отпечатков пальцев" авторы наиболее часто используют Евклидово расстояние, коэффициент корреляции, косинус угла между двумя хроматограммами, PCA, метод k ближайших соседей, t-критерий Стьюдента. Ниже показаны примеры применения этих критериев на практике.

Авторы работы [43] применяли t-критерий Стьюдента к анализу хроматографических "отпечатков пальцев".

Различие r между "отпечатками пальца", составленными из площадей хроматографических пиков двух образцов, или двумя векторами v_1 – исследуемого образца и v_2 – образца сравнения, определяли следующим образом:

$$r = v_1 - v_2, \quad (12)$$

где $v = [v_1, v_2, \dots, v_n]$, здесь v_i – площадь i -го хроматографического пика, $i=1, 2, \dots, n$, n – число выбранных пиков.

Подлежащие сравнению растительные образцы хроматографировали по 10 раз для расчета стандартного отклонения площади каждого "отпечатка пальцев" на хроматограмме, после чего площади всех пиков были нормализованы делением на их стандартные отклонения. Затем по t-критерию Стьюдента определяли статистически значимое отличие нормализованного вектора r от нуля с помощью проверки гипотез. Нулевая гипотеза H_0 и альтернативная гипотеза H_1 означали следующее:

$H_0: r_{\text{ср.}} = 0$, два "отпечатка пальцев" не имеют существенных различий;

$H_1: r_{\text{ср.}} \neq 0$, два "отпечатка пальцев" различаются существенно.

Здесь $r_{\text{ср.}} = \frac{\sum |r_i|}{n}$, r_i – i -ый элемент r , $i = 1, 2, \dots, n$.

Далее рассчитывали коэффициент Стьюдента t по следующей формуле:

$$t = |r| \sqrt{n}, \quad (13)$$

и сравнивали его с табличным значением распределения Стьюдента t для $f = (n-1)$ поскольку одна степень свободы используется для расчета среднего значения $r_{\text{ср.}}$.

Кроме t-критерия Стьюдента к тому же набору данных авторы применили PCA и квадраты косинусов углов. T-критерий наилучшим образом выявлял различия в растительных образцах сложного состава.

В работе [1] авторы использовали метод PCA при выявлении фальсифицированных партий меда. Были взяты 141 образец меда (из них 50 акациевых, 38 каштановых и 53 лавандовых), 35 коммерческих (из пяти стран с теми же цветочными составляющими) и три рекламных. К рекламным образцам были добавлены подсластители для создания фальсифицированных образцов. С помощью метода PCA фальсифицированные образцы были распознаны.

В этой же статье рассматривались 19 образцов Ginkgo, один из которых был стандартным. Степень сходства хроматограмм оценивали, используя коэффициент корреляции Пирсона и косинус угла между двумя хроматограммами. За исключением четырех образцов, все остальные имели степень сходства с коэффициентом корреляции более 0,89. Для подтверждения полученных результатов использовали метод PCA. Авторы показывают, что коэффициент корреляции Пирсона и косинус угла между хроматограммами пригодны для оценки подобия хроматограмм. Для более точного сравнения лучше использовать PCA и SIMCA.

Для поиска различий в образцах *Paria cocos* в работе [19] также использовали метод PCA. Сравнивали 43 образца, один из которых был стандартом, остальные образцы были собраны в различных областях Китая. Авторы заключили, что метод PCA может использоваться для качественной идентификации.

В работе [11] авторы использовали Евклидово расстояние, как быстрый и надежный метод идентификации и контроля качества растительных образцов папоротника.

В работе [21] использовали коэффициент корреляции для сравнения образцов *Cirsium setosum*.

В работе [23] при сравнении хроматограмм *Euonymus alatus* для оценки сходства и различия использовали коэффициент корреляции и косинус угла между хроматограммами, расчёт вели по формулам (5) и (6).

Авторы работы [31] применили различные варианты метода *resampling*. С помощью метода *bootstrap* провели оценку распределения коэффициента корреляции между стандартным "отпечатком пальца" и тестируемым. Авторы работы [44] применили другую разновидность *resampling test-randomization* для анализа гомогенных "отпечатков пальцев" и *crosscorrelation* как функцию качества.

Таким образом, с учетом анализа литературных данных, можно выстроить следующую стратегию сравнительного анализа сложных образцов:

1. постановка задачи (идентификация образца, оценка стабильности образца или сравнение двух или нескольких образцов или партий);
2. оптимизация процесса подготовки проб;
3. оптимизация хроматографических условий получения "отпечатков пальцев", содержащих максимум информации;
4. оценка метрологических характеристик методики получения "отпечатков пальцев";
5. выбор адекватного математического метода сравнения образцов.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Материалы

Зеленый чай:

- Традиционный китайский чай зеленый байховый крупнолистовой, Принцесса Ява (1 партия – дата выпуска 06.2009; 2 партия – дата выпуска 01.2010; 3 партия – дата выпуска 09.2010).
- Премиум. Индонезийский чай зеленый байховый крупнолистовой, Принцесса Ява (1 партия – дата выпуска 04.2009; 2 партия – дата выпуска 10.2009; 3 партия – дата выпуска 06.2010).
- Медиум. Вьетнамский чай зеленый байховый листовой, Принцесса Ява.
- Жасмин. Китайский чай зеленый байховый с ароматом жасмина, Принцесса Ява (жасминовый) (1 партия – дата выпуска 05.2009; 2 партия – дата выпуска 01.2010; 3 партия – дата выпуска 08.2010).
- Lotus Breeze. Китайский зеленый чай, Greenfield (Greenfield).
- Green Symphony. Китайский крупнолистовой чай с лепестками календулы и мальвы, с ароматом тропического манго, Hilltop collection tea (Hilltop).

Лекарственный препарат корвалол:

- Производитель ЗАО "Алтайвитамины", г. Бийск (1 партия - дата выпуска 16.05.2010; 2 партия - дата выпуска 16.05.2010).
- Производитель ОАО "Фармстандарт-Лексредства", г. Курск (1 партия - дата выпуска 01.2008; 2 партия - дата выпуска 10.2010).
- Производитель ЗАО "СЕСАНА", г. Москва.

Молотый кофе:

- Кофе торговой марки "Черная карта". Арабика. Высший сорт (кофе натуральный жареный молотый) (1 партия - дата выпуска 07.2010; 2 партия - дата выпуска 09.2010; 3 партия - дата выпуска 11.2010; 4 партия - дата выпуска 03.2011).
- Кофе торговой марки "Живой кофе"® "Safari Coffee". Espresso, молотый (07.2010)
- Кофе торговой марки "Живой кофе"® "Safari Coffee". Мокко, Африканская арабика, молотый (09.2010).
- Кофе торговой марки "Живой кофе"® "VIP А.М.". Арабика, Espresso, молотый.
- Кофе торговой марки "Davidoff Cafe". 100% Арабика. Натуральный жареный молотый.
- Кофе торговой марки "LavAzza". CREMAeGUSTO GROUND COFFEE. Italian Espresso, молотый.

- Кофе торговой марки "LavAZza". Espresso, молотый.
- Кофе торговой марки "TURATI", Ground Coffee, Арабика, молотый.
- Кофе торговой марки "Tchibo" Exclusive, Арабика, молотый.

Реактивы:

- Ацетонитрил для ВЭЖХ, "сорт 1", $A_{200} = 0,02$ е.о.п. (НПК "Криохром", г. Санкт-Петербург) (ACN).
 - Вода дистиллированная.
 - Реактивы производства "ALDRICH", США: Номер по каталогу
ALDRICH 2003-2004 гг.
- | | |
|-----------------------------|----------|
| Перхлората лития, тригидрат | 20,530-3 |
| Кислота хлорная, 70% | 32,043-9 |

3.2. Оборудование

ВЭЖХ проводили на хроматографе "Милихром А-02" (ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск) с колонкой Ø 2*75 мм, заполненной обращенно — фазовым сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ ("Bischoff, Германия).

Окончательные условия ВЭЖХ анализа для образцов зеленого чая:

- температура колонки: 40°C;
- объем вводимой пробы: 4 мкл;
- скорость потока элюента (F): 150 мкл/мин;
- подвижная фаза: элюент А:[4М LiClO₄ – 0,1М HClO₄]:H₂O (5:95); элюент Б: ACN;
- детектор: длины волн 210, 220, 230, 240, 270, 280, 290, 300 нм, $\tau = 0,18$ с;
- градиент: 2 - 25% ACN за 2500 мкл.

Окончательные условия ВЭЖХ анализа для образцов молотого кофе:

- температура колонки: 40°C;
- объем вводимой пробы: 4 мкл;
- скорость потока элюента (F): 100 мкл/мин;
- подвижная фаза: элюент А:[4М LiClO₄ – 0,1М HClO₄]:H₂O (5:95); элюент Б: ACN;
- детектор: длины волн 210, 220, 230, 240, 270, 280, 290, 300 нм, $\tau = 0,18$ с;
- градиент: 0 – 50 % ACN за 2000 мкл.

Окончательные условия ВЭЖХ анализа для образцов лекарственного препарата:

- температура колонки: 35°C;
- объем вводимой пробы: 4 мкл;
- скорость потока элюента (F): 100 мкл/мин;
- подвижная фаза: элюент А:[4М LiClO₄ – 0,1М HClO₄]:H₂O (5:95); элюент Б: ACN;

- детектор: длины волн 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280 нм, $\tau = 0,18$ с;
- градиент: 5 - 82% АСН за 3280 мкл.

В тех случаях, когда условия отличались от приведенных выше, они указаны в тексте.

Использовали весы аналитические электронные "Adventurer AR0640" ("Ohaus", Швейцария), погрешность взвешивания $\pm 0,2$ мг; термошейкер "TS-100" (ООО "BioSan", Латвия); сушильный шкаф (г. Касимов); автоматические пипетки переменного объема $20 \div 200$ мкл (20 мкл $\pm 4\%$; 200 мкл $\pm 0,25\%$) и $100 \div 1000$ мкл (100 мкл $\pm 2\%$; 1000 мкл $\pm 0,45\%$) "Ленпипет Колор" (ЗАО "ТермоЛабсистемс", г. Санкт-Петербург) со сменными наконечниками; пробирки центрифужные из полипропилена типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл.

Хроматограммы обрабатывались с помощью компьютерной программы "Мультихром-СПЕКТР" (ЗАО "Амперсенд", г. Москва). Для расчетов и графического представления результатов использовали компьютерную программу Microsoft® Excel.

3.3. Приготовление растворов

Раствор перхлората лития. Был приготовлен по "Методике выполнения измерений методом ВЭЖХ № 38-03. Хроматографические и спектральные параметры УФ-поглощающих веществ". № ФР.1.31.2003.00951 [45].

Раствор [ацетонитрил:вода]=[1:1] (об./об.). В центрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл приливали 500 мкл ацетонитрила и 500 мкл воды, перемешивая.

Экстракция образцов зеленого чая. Образцы чая гомогенизировали в агатовой ступке. Определили влажность чая путем сушки и последующего взвешивания [46].

Точные навески около 20 мг гомогенизированного зеленого чая помещали в центрифужные пробирки, прибавляли растворы ацетонитрила в воде (соотношения 1:0; 4:1; 3:2; 2:3; 1:4; 0:1 по объему) из расчета 20 мг чая в 1 мл растворителя и закрывали крышками. Пробирки встряхивали при температуре от 20 до 90 °С в течение $0,4 \div 2,0$ часов на термошейкере. После центрифугирования экстракт разбавляли в 5 раз дистиллированной водой и вводили в хроматограф.

Экстракция образцов молотого кофе. Точные навески около 20 мг молотого кофе помещали в центрифужные пробирки, прибавляли растворы ацетонитрила в воде (соотношения 0:1; 1:3; 1:1; 3:1; 1:0 по объему) из расчета 20 мг кофе в 1 мл растворителя и закрывали крышками. Пробирки встряхивали при температуре от 25 до 60 °С в течение $0,3 \div 1,5$ часов на термошейкере. После центрифугирования экстракт вводили в хроматограф.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Анализ зеленого чая

4.1.1. Определение влажности различных сортов зеленого чая

Перед началом работы с растительными образцами необходимо определить их влажность. Для этого измельчили чай в ступке, поместили в бюксы и поставили в сушильный шкаф на 60 мин при 105 °С [46].

Определение влажности проводили для трех сортов чая (китайского, индонезийского и вьетнамского).

Влажность сырья рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{(m - m') \cdot 100\%}{m}, \quad (14)$$

где x - процент изменения массы навески;

m - масса образца до сушки;

m' - масса образца после сушки. Результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1. Изменение массы навесок чая после сушки

Сорт чая	Масса до сушки, г	Масса после сушки, г	
		В этот же день	Через два дня
китайский	26,174	25,751 (-1,6%)	25,755 (+0,02%)
индонезийский	27,918	27,532 (-1,4%)	27,535 (+0,01%)
вьетнамский	30,506	30,106 (-1,3%)	30,110 (+0,01%)

Так как процент изменения массы навесок не превышает 1,6%, то для решения нашей задачи в дальнейшей работе можно использовать чай без предварительной сушки.

4.1.2. Выбор оптимальных условий хроматографического анализа

Выбор условий хроматографирования начинали с условий, приведенных в методике [45]. Градиент был модифицирован для лучшего разделения компонентов чая.

Начальные условия хроматографирования были следующими:

- колонка 2*75 мм с ProntoSIL-120-5 C18 AQ;
- элюенты: А – [4М LiClO₄—0,1М HClO₄]:H₂O (5:95), Б – ACN;
- детектор: 210, 220, 230, 240, 270, 280, 290, 300 нм; τ=0.18с;
- объем пробы 4 мкл;
- градиент: от 5% до 50% Б за 3000 мкл; 100% Б 3 мин; F = 150 мкл/мин; t = 40°C.

Условия хроматографирования подбирали при следующих начальных условиях подготовки проб:

- масса навески 20 мг;
- экстрагент: АСN: Н₂O = 1:1 (об./об.);
- 1 мл экстрагента на 20 мг чая;
- время экстракции 40 мин.

Смесь ацетонитрил-вода была выбрана в качестве экстрагента из литературных данных [9].

В этих условиях записаны хроматограммы 3 сортов чая и для дальнейших экспериментов выбран вьетнамский зеленый чай (рис. 2), как наиболее богатый по составу.

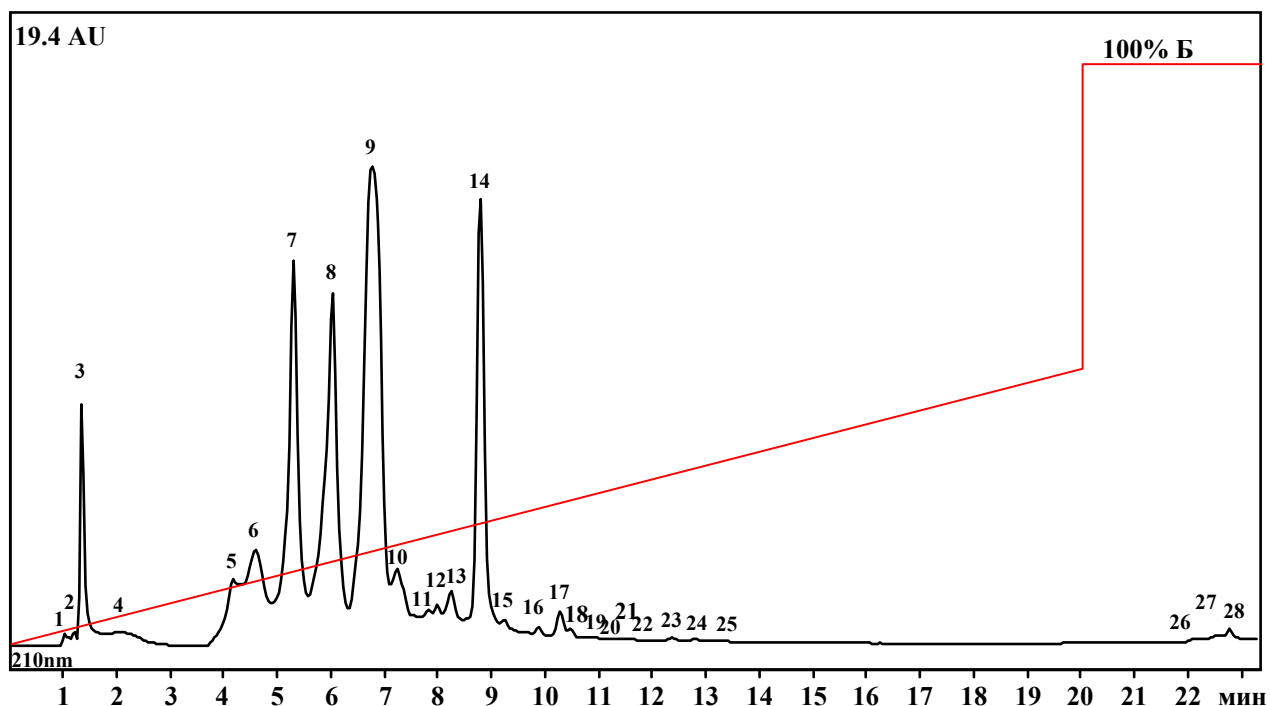


Рис. 2. Хроматограмма экстракта вьетнамского зеленого чая при начальных хроматографических условиях. Наклонной прямой линией со ступенькой здесь и далее показана форма градиента.

Поскольку для основных пиков превышен линейный диапазон детектора (18 е.о.п.), далее растворы после проведения экстракции разбавлялись в 5 раз.

Для улучшения разделения основных пиков градиент был изменен на более пологий: регенерация 2% Б 600 мкл; элюция от 2% до 25% Б за 2500 мкл; $F = 150$ мкл/мин; $t = 40^\circ\text{C}$ (рис. 3).

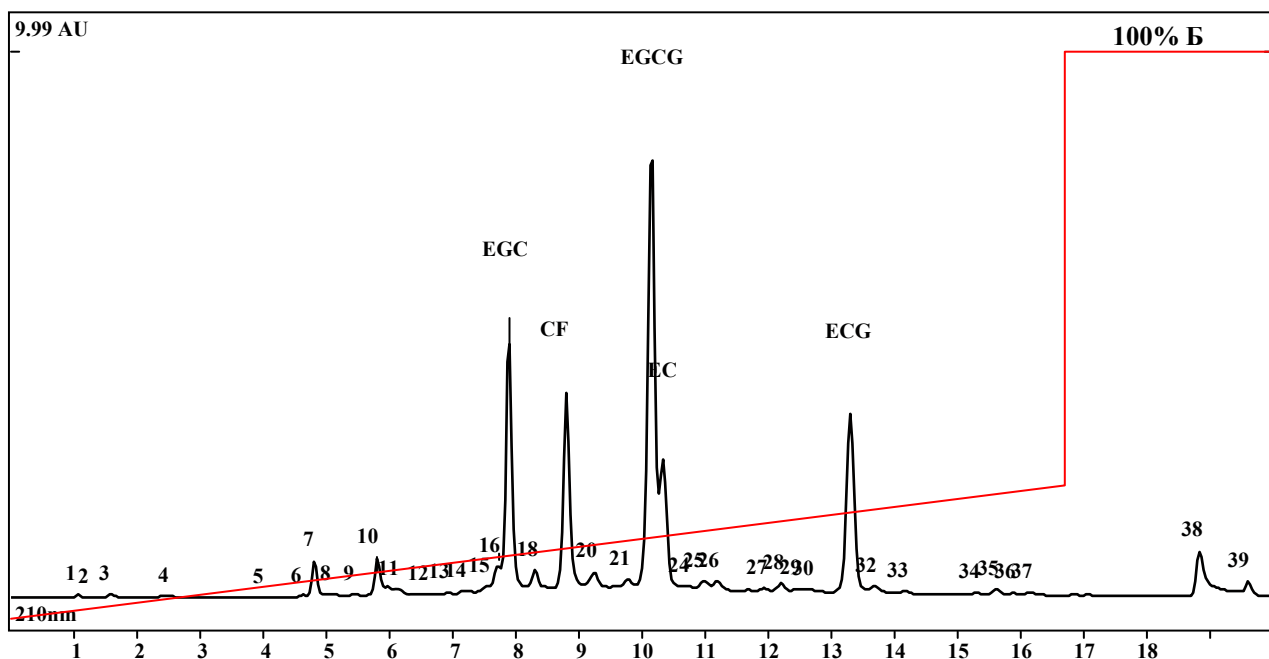


Рис. 3. Хроматограмма экстракта вьетнамского зеленого чая в оптимизированных хроматографических условиях.

Данную форму градиента считали оптимальной и использовали ее для дальнейших анализов.

4.1.3. Идентификация основных хроматографических пиков

Поскольку стандартов главных компонентов зеленого чая — катехинов и кофеина у нас не было, предварительная идентификация основных пиков была проведена с помощью данных о УФ-спектрах катехинов [47] и по виду хроматограммы зеленого чая, приведенной в литературе (рис. 4) [27]. В табл. 2 представлено сравнение литературных данных с данными полученными экспериментально. Идентификация пика кофеина подтверждена также по Базе данных ВЭЖХ-УФ [45].

Таблица 2. Литературные и экспериментальные данные по спектральным отношениям для основных пиков зеленого чая.

Номер пика (рис.3)	Вещество	Литературные данные		Экспериментальные данные			
		λ_{\max}	A_{210}/A_{\max}	λ_{\max}	A_{\max}	A_{210}	A_{210}/A_{\max}
17	EGC	271	32	270	0,1	3,8	38,9
19	CAF	—	—	274	1,2	3,1	2,5
22	EGCG	275	8	274	1,1	7,8	7,4
23	EC	279	14	278	0,1	1,4	12,2
31	ECG	279	6	278	0,4	2,2	5,3

EGC-эпигаллокатехин, CAF-кофеин, EGCG-эпигаллокатехингаллат, EC-эпикатехин, ECG-эпикатехингаллат.

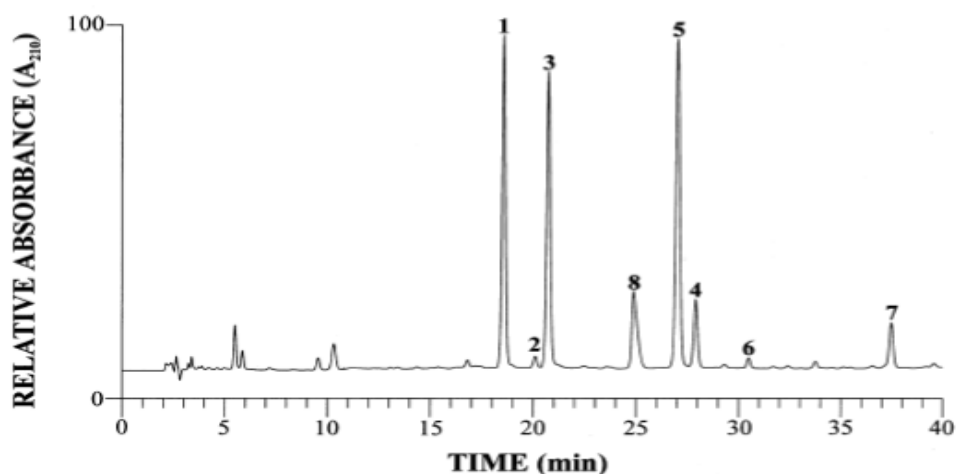


Рис. 4. Хроматограмма водного экстракта зеленого чая на колонке Zorbax Eclipse XDB-C₁₈, элюент А: Н₂О – 0.05% ТФА; элюент Б: 60:40 МеОН–АСН, 0.05% ТФА. Градиент: 0 мин - 10% Б, 5 мин – 15% Б, 50 мин - 40% Б. Идентификация пиков: 1-EGC, 2-С, 3-CAF, 4-EC, 5-EGCG, 6-GCG, 7-ECG, 8-L-триптофан (внутренний стандарт) [17]. ТФА – трифторуксусная кислота, МеОН – метанол.

4.1.4. Выбор оптимальных условий экстракции

Выбор времени экстракции

Навески чая экстрагировали смесью АСН:Н₂О = 1:1 (об./об.) 15÷120 мин., центрифугировали пять минут при 12000 г. 100 мкл надосадочной жидкости разбавили 400 мкл воды, перемешали и ввели в хроматограф. Полученные данные представлены на рис. 5.

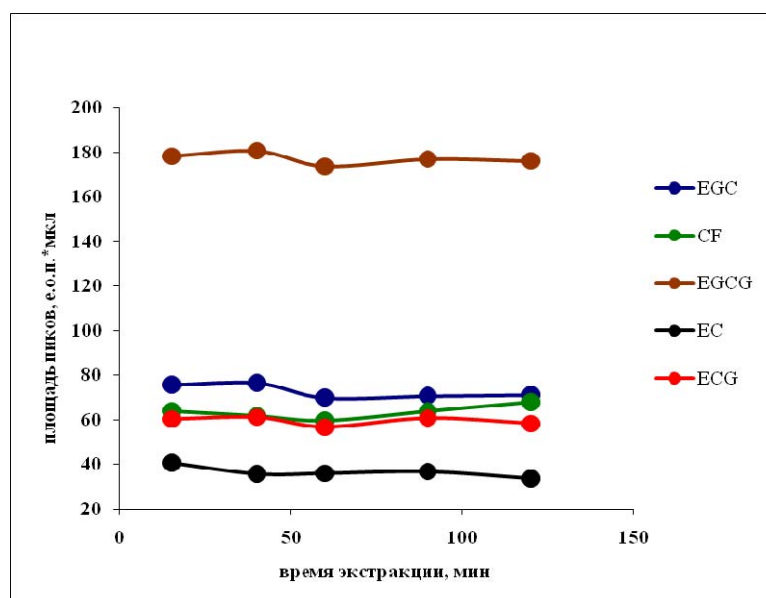


Рис. 5. Зависимость площади основных пиков от времени экстракции чая.

Было выбрано время экстракции 40 мин, как наиболее удобное.

Выбор соотношения вода-органический растворитель

Навески чая экстрагировали ацетонитрильным раствором различной концентрации в диапазоне 0÷100% органического растворителя при комнатной температуре 40 мин. Полученные данные представлены на рис. 6.

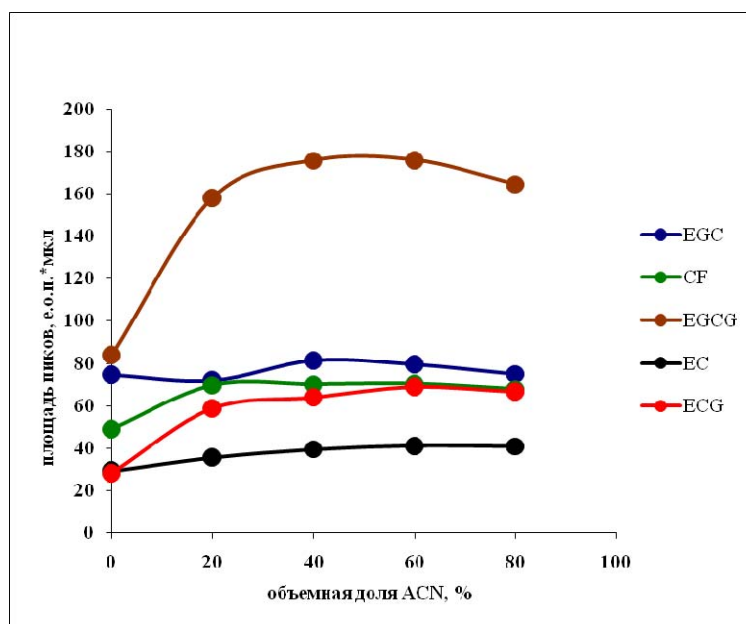


Рис. 6. Выбор соотношения вода-ацетонитрил.

Наилучший состав экстрагента ACN:H₂O = 1:1 (об./об.) (50%).

Зависимость экстракции основных компонентов зеленого чая от температуры

Навески чая экстрагировали смесью ACN:H₂O = 1:1 (об./об.) в течение 40 мин при различной температуре (20÷90 °С). Полученные данные представлены на рис. 7.

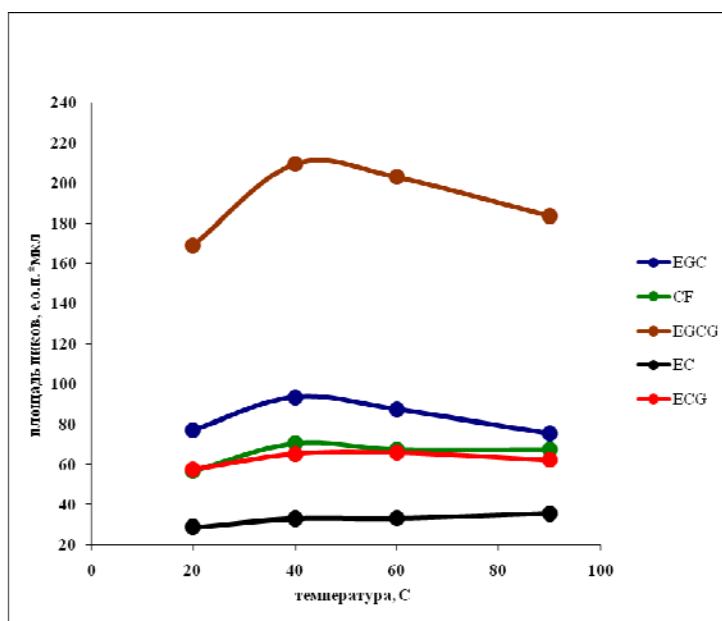


Рис. 7. Экстракция смесью ACN:H₂O = 1:1 (об./об.) при различной температуре.

Для последующих экспериментов была выбрана оптимальная температура — 40°С.

Окончательные условия экстракции:

1. время экстракции: 40 мин;
2. состав экстрагента: АСN:H₂O = 1:1 (об./об.);
3. температура экстракции: 40°C.

При сравнении хроматографических "отпечатков пальцев" необходимо оценить такие метрологические характеристики, как повторяемость и внутрилабораторную прецизионность.

4.1.5. Оценка метрологических характеристик методики определения компонентов чая (повторяемости и внутрилабораторной прецизионности)

Повторяемость оценивали по шести хроматограммам разных экстрактов вьетнамского зеленого чая, приготовленных в оптимизированных условиях – 4.1.4. Образцы анализировались в один день в оптимизированных условиях – 4.1.2.

Хроматографическую повторяемость оценивали путем шестикратного хроматографирования одного и того же образца вьетнамского зеленого чая.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности методики подготовки пробы зеленого чая, были получены экстракты шести сортов (вьетнамский, китайский, индонезийский, жасминовый, Greenfield, Hilltop) 1 партии чая в смеси АСN:H₂O = 1:1 (об./об.). Готовили по одной пробе каждого из сортов и хроматографировали на протяжении десяти дней в случайном порядке.

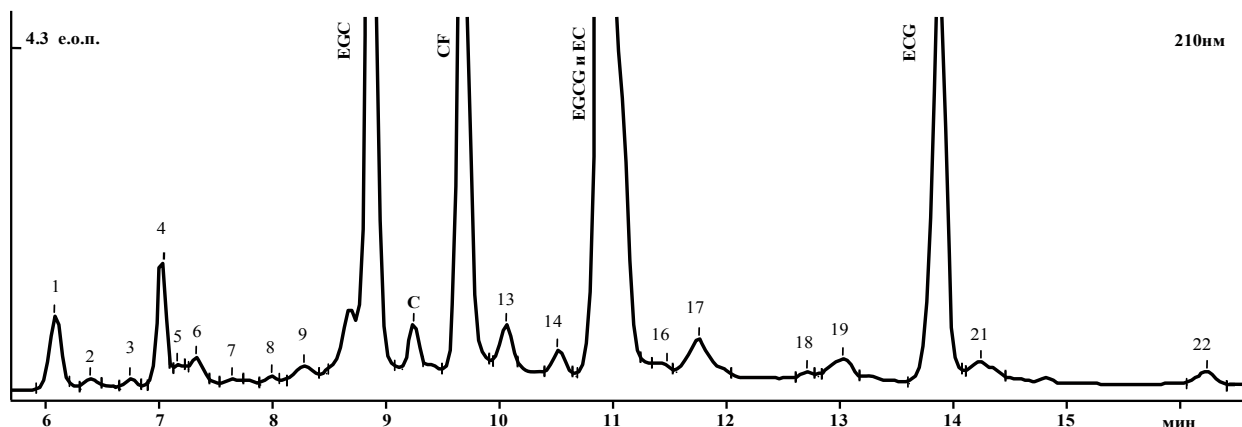


Рис. 8. Размеченная на компоненты хроматограмма вьетнамского зеленого чая.

Хроматограммы размечались на пики с помощью программы «МультиХром». Для сравнения хроматограмм мы выбрали 22 компонента, отмеченные на рис. 8. Далее данные экспортировались в расчетную программу Microsoft® Excel и по ним проводили все необходимые расчеты. В качестве примера расчета повторяемости и внутрилабораторной прецизионности в табл. 3 представлены результаты для основных компонентов вьетнамского чая.

Таблица 3. Результаты повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики экстракции для основных компонентов вьетнамского зеленого чая.

Основные компоненты	СКО, % хроматографической повторяемости (n=6)	СКО, % повторяемости (n=6)	СКО, % внутрилабораторной прецизионности (n=10)
EGC	2,3	3,8	6,3
CF	2,4	2,7	3,3
EGCG и EC	1,3	1,0	1,9
ECG	2,0	2,2	3,2

Полученные значения повторяемости и внутрилабораторной прецизионности позволяют проводить сравнение разных образцов чая по хроматограммам.

4.1.6. Сравнение часто применяемых методов оценки сходства и различия хроматографических "отпечатков пальцев" на примере зеленого чая

В расчетах использовались относительные площади пиков, выбранных для сравнения хроматографических "отпечатков пальцев" компонентов.

Рассчитывались следующие параметры: среднее значение и дисперсия для относительных площадей пиков каждого из 22 компонентов. Эти параметры затем использовались далее для расчета критериев сходства и различия (коэффициента корреляции, Евклидова расстояния и t-критерия Стьюдента).

Коэффициент корреляции рассчитывался по формуле (5), Евклидово расстояние рассчитывалось по формуле (7).

При расчете t-критерия Стьюдента проверяли гипотезы о совпадении или различии математических ожиданий – $M(X)$ и $M(Y)$. В нашем случае математические ожидания – это средние значения площадей пиков в двух выборках из хроматограмм экстрактов сравниваемых образцов.

H_0' : $M(X) = M(Y)$ — различия в образцах отсутствуют

H_1' : $M(X) \neq M(Y)$ — различия присутствуют

Классические условия применимости t-критерия Стьюдента – нормальное распределение и равенство дисперсий результатов измерений проверяемых выборок – вытекают из методики получения результатов измерений: хроматограммы экстрактов образцов с близким качественным составом получают на одном приборе, по одной методике, с одинаковым числом повторов, в случайном порядке.

По площадям пиков каждого компонента для каждой из двух сравниваемых выборок вычисляли среднее арифметическое, дисперсию и статистику Стьюдента t (по формуле (10)).

Затем модули значения t усреднялись по всем компонентам:

$$t_{\text{ср}} = \frac{\sum |t_R|}{k}, \quad (15)$$

где k – число пиков компонентов на хроматограмме.

Рассчитанный таким образом $t_{\text{ср}}$ сравнивали с табличным значением t -критерия Стьюдента для выбранного уровня доверительной вероятности P (обычно $P = 0,95$) и числа степеней свободы $f = 2n - 2 = 18$, где n – число повторных хроматограмм для каждого образца.

Мы считаем, что описанный нами подход в применении t -критерия Стьюдента более корректен, чем в работе [43], поскольку в нашем варианте сравнения "отпечатков пальцев" фактически проверяется, отличаются ли средние значения площадей пиков на хроматограммах двух образцов от случайной ошибки метода анализа. На наш взгляд авторы [43] не правильно оценивают число степеней свободы при вычислении статистики Стьюдента t .

Первоначально мы применили самый простой способ оценки сходства и различия: отношение площадей пиков. На рис. 9 показано сравнение разных сортов чая по относительным площадям пиков.

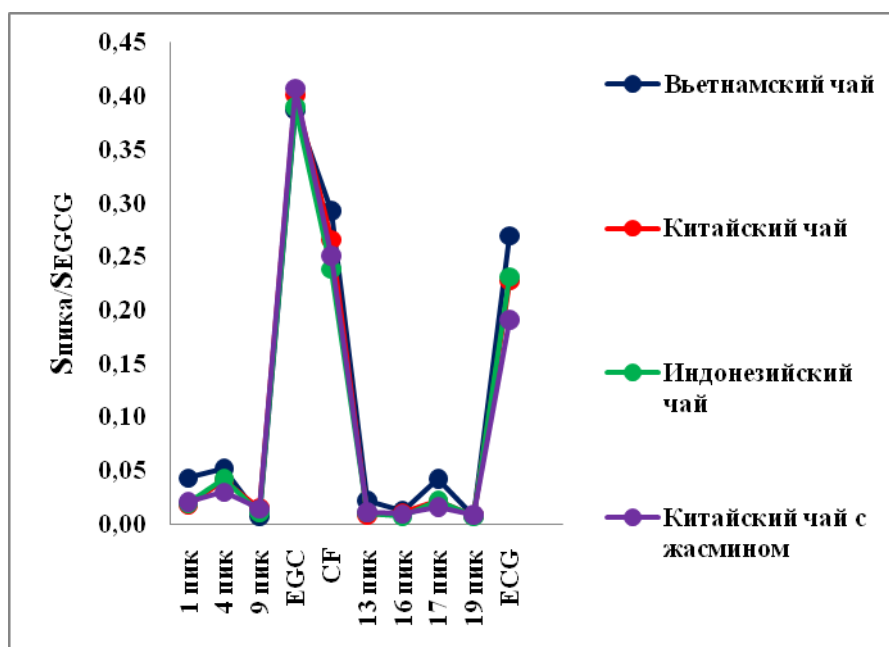


Рис. 9. Отношение средних площадей основных пиков к площади максимального пика - EGC.

Из рис. 9 видно, что отношение площадей пиков не позволяет установить степень сходства или различия разных сортов чая, поэтому этот способ сравнения "отпечатков пальцев" в дальнейшем не использовался.

Результаты по всем изученным критериям представлены в табл. 4. Результаты приведены по убыванию значений t-критерия Стьюдента. Полученные данные для t-критерия сравнивали с теоретическим значением $t(0,95;18) = 2,11$.

Таблица. 4. Сравнение "отпечатков пальцев" различных сортов зеленого чая с помощью различных математических критериев.

№	Пары сортов	Коэффициент корреляции	Евклидово расстояние	Т-критерий Стьюдента $t(0,95;18)_{\text{теорет}}=2,11$
1	В-Н	0,21 <i>min</i>	3,65 <i>max</i>	15,43 <i>max</i>
2	В-Ж	0,25	2,54	9,15
3	В-К	0,38 <i>max</i>	1,80	9,07
4	В-И	0,24	1,95	8,52
5	Г-Н	0,25	3,39	8,36
6	В-Г	0,27	1,86	8,09
7	К-Н	0,22	2,15	7,60
8	И-Н	0,36	2,07	7,54
9	К-Г	0,26	1,83	4,97
10	И-Г	0,26	1,98	4,85
11	Ж-Г	0,34	2,40	4,63
12	Ж-Н	0,25	1,68	4,30
13	И-Ж	0,28	1,34	3,31
14	К-И	0,36	0,92 <i>min</i>	2,98
15	К-Ж	0,22	1,30	2,94 <i>min</i>

В - вьетнамский; К – китайский; И – индонезийский; Ж – чай с жасмином; Г - Greenfield; Н - Hilltop.

На рис. 10 показаны результаты табл. 4 в графическом представлении. Для Евклидова расстояния и t-критерий Стьюдента, значения уменьшены в 3 и 5 раз, соответственно, для наглядности представления.

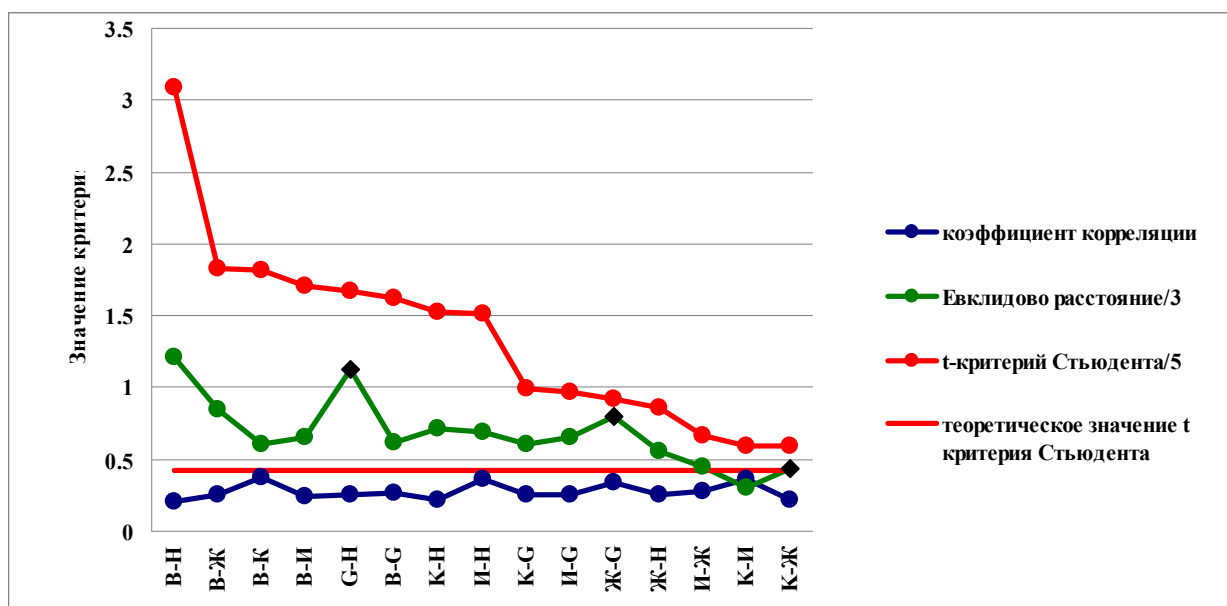


Рис. 10. Результаты сравнения различных сортов чая по нормированным критериям.

Результаты сравнения "отпечатков пальцев" всех сортов между собой по коэффициенту корреляции лежат в узком диапазоне $0,21 \div 0,38$; по Евклидову расстоянию в среднем диапазоне $0,92 \div 3,65$; по t-критерию Стьюдента в широком диапазоне $2,94 \div 15,43$ значений. По данным, приведенным в табл. 4, видно, что свои максимальные и минимальные значения критерии принимают для разных пар сортов чая. Например, если сравнить пары В-Ж, G-Н и Ж-Н, то значение коэффициента корреляции для них одинаковое, а вот значения двух других критериев (Евклидово расстояние и t-критерий Стьюдента) значительно между собой различаются. Аналогичная тенденция наблюдается и для пар К-Н и К-Ж. Таким образом, коэффициент корреляции не выявляет существенных различий в образцах.

При сравнении зависимостей, представленных на рис. 10, видно, что Евклидово расстояние и t-критерия Стьюдента, имеют схожие тенденции, однако, для трех образцов (G-Н, Ж-G и К-Ж) для Евклидова расстояния имеются выбросы. Коэффициент корреляции, который должен иметь противоположную направленность по сравнению с t-критерием Стьюдента и Евклидовым расстоянием, это не демонстрирует. Он просто колеблется вокруг среднего значения. В отличие от t-критерия Стьюдента, Евклидово расстояния вычисляются с помощью сложных алгоритмов, что делает этот критерий неудобным для решения наших задач.

Таким образом, из всех изученных методов t-критерий Стьюдента является наилучшим простым методом, позволяющим устанавливать степень сходства и различия образцов сложного состава.

4.1.7. Применение t-критерия Стьюдента для проверки стабильности образцов и сравнения разных партий образцов

Для проверки стабильности одной партии и сравнения между собой различных партий одного сорта, готовили экстракты трех разных партий трех сортов зеленого чая: китайского, индонезийского и жасминового.

Стабильность образцов чая одной партии проверяли спустя месяц, семь месяцев и 12 месяцев. Для этого через один, семь и 12 месяцев в течение одного дня анализировали по 10 проб одной партии каждого из трех сортов. Результаты представлены в табл. 5.

Для сравнения разных партий одного сорта, эксперимент проводили на протяжении 10 дней, в каждый из дней анализировали по одной пробе каждого из трех сортов из двух сравниваемых партий (шесть проб), в случайном порядке. Результаты представлены в табл. 6. Результаты сравнивали с теоретическим значением $t(0,95;18) = 2,11$.

Таблица 5. Стабильность образцов во времени. Значение t-критерия Стьюдента.

	К	И	Ж
1 месяц	2,11	2,04	1,40
7 месяцев	2,49	2,53	2,28
12 месяцев	3,60	3,44	3,38

К, И, Ж – китайский, индонезийский, жасминовый сорта зеленого чая, соответственно.

Из полученных данных по стабильности образцов во времени можно сделать следующий вывод: через один месяц значимых отличий не наблюдается, т.к. значение t-критерия Стьюдента не превышает теоретическое значение (2,11). Через семь месяцев все значения t превышают теоретическое, что свидетельствует о появлении различий в образцах, т.е. о нестабильности образцов. Через 12 месяцев различия между образцами увеличиваются.

Таблица 6. Сравнение разных партий. Значение t-критерия Стьюдента.

	К 1 партия	И 1 партия	Ж 1 партия
2 партия	1,64	4,37	3,77
3 партия	2,47	3,27	3,90

К, И, Ж – китайский, индонезийский, жасминовый сорта зеленого чая, соответственно.

Из сравнения трех партий образцов (даты выпуска в среднем между собой отличаются на шесть месяцев) видно, что 1 и 2 партии китайского чая не различаются между собой, а партии индонезийского и жасминового чая по всем трем сортам имеют значимые различия.

Таким образом, с помощью t-критерия Стьюдента мы можем сравнивать образцы близкого качественного состава (разные сорта чая), сравнивать разные партии образцов одного сорта и оценивать стабильность образцов во времени.

Поскольку t-критерий Стьюдента позволяет сравнивать данные, полученные ранее, с новыми данными, то можно создавать базы данных эталонных многокомпонентных образцов для подтверждения тождественности сложных растительных объектов.

После проведенных исследований можно предложить следующую схему оценки сходства и различия хроматограмм многокомпонентных образцов с помощью t-критерия Стьюдента:

1. Оптимизация методики экстракции и ВЭЖХ анализа.
2. Оценка метрологических характеристик (повторяемости и внутрилабораторной прецизионности).
3. Вычисление средних значений площади пика и дисперсии для каждого из выбранных компонентов для двух сравниваемых образцов.
4. Вычисление статистика Стьюдента t по формулам (9,10) и далее усреднение ее по всем выбранным компонентам (15) для двух сравниваемых образцов.
5. Сравнение вычисленного значения t с теоретическим для заданной вероятности и числа степеней свободы ($f = m+n-2$, где m и n – число повторных хроматограмм для каждого из образцов, $f = 2n-2$ при одинаковом числе измерений).

Для извлечения максимума информации из хроматографического "отпечатка пальца" необходимо получить наилучшее разделение. Важный аспект при оптимизации условий получения хроматографических "отпечатков пальцев" – это выбор подходящего критерия для оценки качества полученных "отпечатков пальцев". Мы проверяли следующие критерии: сумма разрешений, нормализованный фактор, информационное содержание и HCRF. Выбор наилучшего критерия оптимизации проводили на примере лекарственного препарата корвалол, т.к. это готовая лекарственная форма и подходит для непосредственного хроматографического анализа.

4.2. Анализ лекарственного препарата корвалола

4.2.1. Выбор оптимальных условий хроматографического анализа

Выбор условий хроматографирования производили при помощи критериев оптимизации, описанных ранее в пункте 2.4.

Оптимизировали следующие параметры: форму градиента, температуру колонки, скорость элюирования, объем пробы, аналитическую длину волны.

При выборе **формы градиента**, были рассмотрены следующие варианты:

- 5-100% Б за 4000 мкл;
- 0-90 % Б за 3500 мкл;
- 7-90 % Б за 3500 мкл;
- 10-90 % Б за 3500 мкл;
- 15-85 % Б за 3300 мкл;
- 5-100 % Б, за 4000 мкл, элюент А, рН=5,6.

Элюент А:[4М LiClO₄ – 0,1М HClO₄]:H₂O (5:95), рН=2,3; элюент Б: ACN.

Для расчета критериев оптимизации использовали все пики на хроматограмме с высотой более 0,001 е.о.п.

В этих условиях были записаны хроматограммы. Результаты по критериям оптимизации представлены в табл. 7.

Таблица 7. Выбор формы градиента.

№	Форма градиента	$\sum R_s$	r	Φ	HCRF
1	5-100 % Б	43,3	0,008	0,35	42,29,69
2	5-100 % Б	33,5	0,033	0,37	32,45,70
3	0-90 % Б	51,7	0,033	0,32	39,47,69
4	7-90 % Б	40,8	0,020	0,36	39,41,70
5	10-90 % Б	40,5	0,040	0,35	38,55,65
6	15-85 % Б	39,1	0,037	0,32	35,45,71

Наилучший градиент 1 (5-100 % Б) (наибольшее значение HCRF, высокое Φ и $\sum R_s$). Для сокращения времени хроматографии выбран следующий окончательный градиент: 5-82 % Б за 3280 мкл.

Данные по выбору **температуры колонки** представлены в табл. 8.

Таблица 8. Выбор температуры колонки.

№	Температура колонки, °С	ΣR_s	r	Φ	HCRF
1	35	47,9	0,023	0,42	43,53,68
2	40	43,3	0,008	0,35	42,29,69
3	45	46,4	0,015	0,36	40,53,69
4	50	51,1	0,012	0,33	34,51,69

Наилучшая температура 35 °С (наибольшее значение HCRF и Φ , большое значение ΣR_s).

Данные по выбору **скорости элюирования** представлены в табл. 9.

Таблица 9. Выбор скорости элюирования.

№	Скорость элюирования, мкл/мин	ΣR_s	r	Φ	HCRF
1	100	55,1	0,025	0,39	44,58,69
2	150	49,5	0,022	0,41	44,49,79
3	200	48,7	0,006	0,40	42,38,84

Наилучшая скорость 100 мкл/мин (наибольшее значение ΣR_s , r и HCRF).

Данные по выбору **объема пробы** представлены в табл. 10.

Таблица 10. Выбор объема пробы.

№	Объем пробы, мкл	ΣR_s	r	Φ	HCRF
1	2	52,3	0,004	0,31	42,57,70
2	4	55,1	0,004	0,40	44,48,69

Наилучший объем 4мкл (наибольшее значение ΣR_s , Φ и HCRF).

Данные по выбору **аналитической длины волны**, представлены в табл. 11.

Таблица 11. Выбор аналитической длины волны.

№	Длина волны, нм	ΣR_s	r	Φ	HCRF
1	210	55,1	0,025	0,39	44,58,69
2	220	54,5	0,013	0,37	40,52,69
3	230	57,5	0,003	0,35	42,55,69
4	240	53,1	0	0,29	32,50,69
5	260	101,2	0	0,23	23,53,68

Аналитическая длина волны 210 нм (наибольшее значение r, Φ и HCRF).

На основании полученных результатов мы пришли к выводу, что наиболее удобным и информативным является критерий HCRF, его и использовали в дальнейшем для определения оптимальных условий получения хроматографических "отпечатков пальцев".

Выбрав наилучший критерий оптимизации, мы сравнили образцы корвалола разных партий и от разных производителей между собой с помощью выбранного ранее t-критерия Стьюдента. Для этого мы оценили повторяемость и внутрилабораторную прецизионность методики определения компонентов корвалола.

4.2.2. Оценка метрологических характеристик методики определения компонентов корвалола (повторяемости и внутрилабораторной прецизионности)

Для оценки повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики хроматографического анализа использовали образец "Фармстандарта"-1. Для оценки повторяемости в один день было записано 12 проб этого образца, для оценки внутрилабораторной прецизионности хроматограммы образца записывались на протяжении 13 дней.

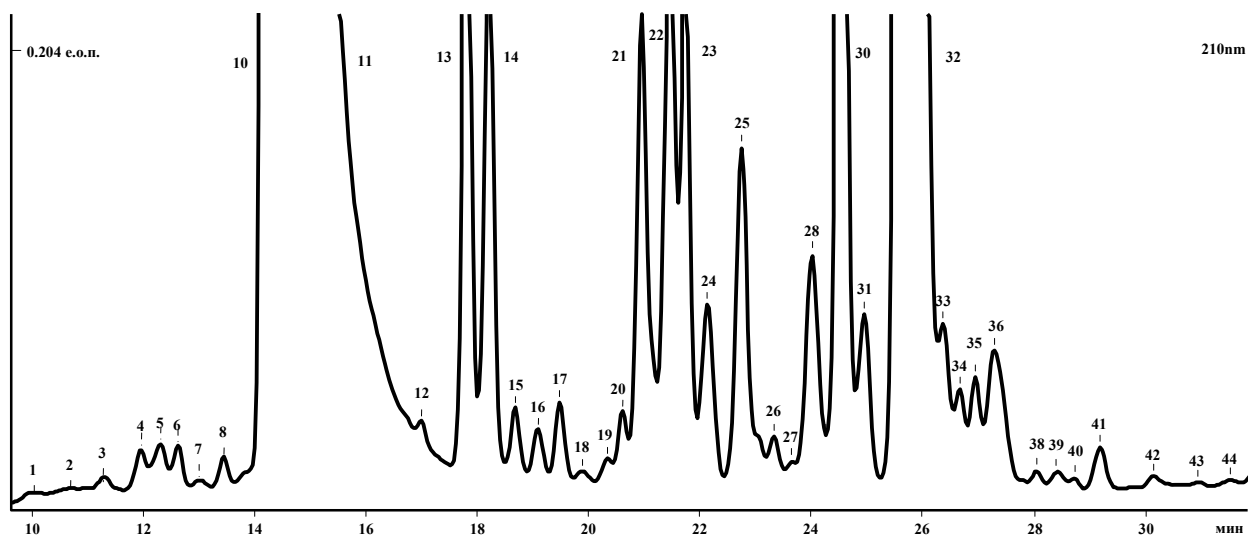


Рис. 11. Размеченная на компоненты хроматограмма корвалола.

Для сравнения хроматограмм мы выбрали 44 компонента, отмеченные на рис. 11. В качестве примера расчета повторяемости и внутрилабораторной прецизионности в табл. 12 представлены результаты для основных компонентов корвалола.

Таблица 12. Результаты повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики хроматографического анализа для основных компонентов корвалола.

Номер компонента (рис. 11)	Относительная площадь, %	СКО, % повторяемости (n=12)	СКО, % внутрилабораторной прецизионности (n=13)
10	78,9	0,5	1,9
13	0,6	2,3	4,9
14	0,5	2,1	5,5
21	0,5	2,4	3,5
22	0,5	3,5	1,7
23	0,5	3,6	3,7
25	0,4	1,8	4,6
30	1,2	1,9	2,0
32	14,8	2,2	2,6
36	0,2	3,1	4,9

Как и ожидается значения для СКО повторяемости меньше, чем СКО внутрилабораторной прецизионности. Результаты по внутрилабораторной прецизионности лежат в интервале 1,7 – 5,5 %, что позволяет использовать критерий Стьюдента для сравнения образцов между собой.

4.2.3. Применение t-критерия Стьюдента для сравнения разных образцов корвалола

Для сравнения разных образцов корвалола (образцов от разных производителей и из разных партий одного производителя), эксперимент проводили на протяжении 13 дней, в каждый из дней анализировали по одной пробе каждого из пяти образцов корвалола в случайном порядке. Результаты представлены в табл. 13. Полученные данные сравнивали с теоретическим значением $t(0,95; 24) = 2,06$.

Таблица 13. Результаты сравнения, разных партий образцов корвалола.

	Ф-1	С	А-2	Ф-2
А-1	26,7	16,8	3,1	28,4
Ф-1		18,1	32,8	16,3
С			21,3	18,3
А-2				34,1

А-1 – "Алтайвитамины" первая партия, Ф-1 – "Фармстандарт" первая партия, С – "Сесана", А-2 – "Алтайвитамины" вторая партия, Ф-2 – "Фармстандарт" вторая партия.

По результатам сравнения пяти образцов корвалола можно сделать вывод, что все образцы между собой различаются. Самое близкое значение к теоретическому значению t критерия ($t(0,95; 24) = 2,06$), характеризующего отсутствие значимых различий, имеет пара А-1 и А-2 ($t = 3,1$). Различие образцов с одной датой выпуска можно объяснить тем, что они были приобретены в разных местах и в течение более полугода хранились при разных условиях. Условия хранения могли повлиять на поведение нестабильных компонентов растительного происхождения, содержащихся в составе препарата. Что касается образцов Ф-1 и Ф-2 ($t = 16,3$), то значение их t критерия намного отличается от теоретического, что не удивительно т.к. дата их выпуска различается в два года. Образцы корвалола от разных производителей имеют еще большие различия, чем образцы из разных партий одного производителя (например, А-1 и Ф-1 $t = 26,7$; А-1 и С $t = 16,8$; А-1 и Ф-2 $t = 28,4$; Ф-1 и С $t = 18,1$; Ф-1 и А-2 $t = 32,8$; С и А-2 $t = 21,3$; Ф-2 и С $t = 18,3$; Ф-2 и А-2 $t = 34,1$, а также А-1 и А-2 $t = 3,1$; Ф-1 и Ф-2 $t = 16,3$).

Различия в значениях t -критерия для образцов корвалола существенно больше, чем для чая, что легко объяснимо большей нестабильностью компонентов в растворе по сравнению с сухой формой.

На примере зеленого чая мы выбрали наилучший математический критерий (t -критерий Стьюдента) для сравнения образцов близкого качественного состава. На примере корвалола был выбран наилучший критерий оптимизации хроматографического анализа (HCRF).

Используя эти результаты, мы подобрали наилучшие условия подготовки пробы и хроматографического анализа и провели сравнение образцов молотого кофе разных партий и разных производителей.

4.3. Анализ молотого кофе

4.3.1. Выбор оптимальных условий хроматографического анализа

Выбор условий хроматографирования производили при помощи критерия HCRF.

Оптимизировали следующие параметры: форму градиента, температуру экстракции, время экстракции, состав экстрагента.

При выборе **формы градиента**, были рассмотрены следующие варианты:

- 0-50% Б за 2000 мкл;
- 5-50% Б за 2000 мкл;
- 10-50% Б за 2000 мкл;
- Элюент А: [4М LiClO₄ – 0,1М HClO₄]:H₂O (5:95), pH=2,3; элюент Б: ACN.

В этих условиях были записаны хроматограммы. Данные по выбору **формы градиента** представлены в табл. 14.

Таблица 14. Выбор формы градиента.

№	Форма градиента	HCRF
1	0-50% Б за 2000 мкл	22,39,80
2	5-50% Б за 2000 мкл	20,45,80
3	10-50% Б за 2000 мкл	17,40,80
4	0-50% Б за 1800 мкл	19,38,82
5	0-50% Б за 1500 мкл	17,39,85

Наилучший градиент 1 (0-50 % Б за 2000 мкл).

Данные по выбору **температуры экстракции** представлены в табл. 15.

Таблица 15. Выбор температуры экстракции.

№	Температура экстракции, °С	HCRF
1	25	23,41,80
2	40	23,41,80
3	50	24,51,80
4	60	23,29,80

Наилучшая температура экстракции 50 °С.

Данные по выбору **времени экстракции** представлены в табл. 16.

Таблица 16. Выбор времени экстракции.

№	Время экстракции, мин	HCRF
1	20	23,51,80
2	40	23,43,80
3	60	23,50,80
4	90	23,41,80

Наилучшее время экстракции 20 мин.

Данные по выбору **состава экстрагента** представлены в табл. 17.

Таблица 17. Выбор состава экстрагента.

№	ACN, %	HCRF
1	0	45,32,80
2	25	32,57,80
3	50	28,39,80
4	75	19,55,80
5	100	18,71,80

Наилучший состав экстрагента 100% H₂O (0% ACN).

4.3.2. Оценка метрологических характеристик методики определения компонентов молотого кофе (повторяемости и внутрилабораторной прецизионности)

Для оценки повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики хроматографического анализа использовали образец "Черная карта" (07.10). Для оценки повторяемости в один день было записано 10 хроматограмм разных экстрактов одного образца, для оценки внутрилабораторной прецизионности хроматограммы разных экстрактов записывались на протяжении 10 дней.

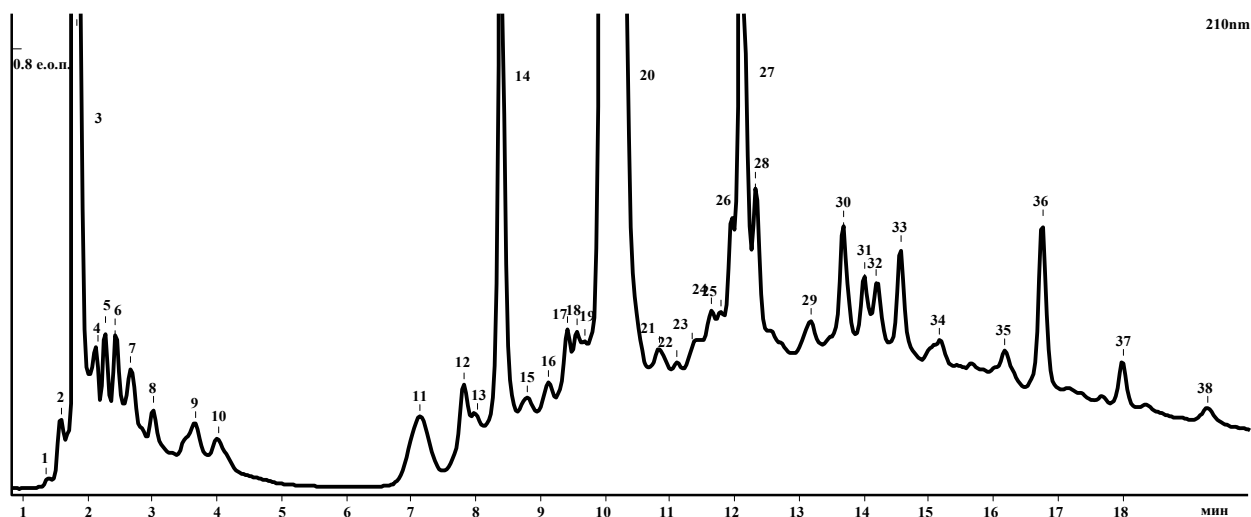


Рис. 12. Размеченная на компоненты хроматограмма молотого кофе.

Для сравнения хроматограмм мы выбрали 38 компонентов, отмеченные на рис. 12. В качестве примера расчета повторяемости и внутрилабораторной прецизионности в табл. 18 представлены результаты для основных компонентов молотого кофе.

Таблица 18. Результаты повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики хроматографического анализа для основных компонентов молотого кофе.

Номер компонента (рис. 12)	Относительная площадь, %	СКО, % повторяемости (n=10)	СКО, % внутрилабораторной прецизионности (n=10)
5	0,9	9,6	13,9
6	1,1	6,0	6,1
7	1,4	9,8	10,9
14	4,3	1,6	2,8
19	63,3	2,2	1,2
26	3,2	2,6	7,9
35	1,2	4,7	3,5

Результаты по повторяемости и внутрилабораторной прецизионности для молотого кофе оказались в ряде случаев хуже, чем для чая и корвалола, тем не менее мы использовали их для сравнения образцов по t-критерию Стьюдента.

4.3.3. Применение t-критерия Стьюдента для сравнения разных образцов молотого кофе

Для сравнения разных образцов молотого кофе (от разных производителей и из разных партий одного производителя) анализировали по одной пробе каждого из 12 образцов молотого кофе в течение 10 дней в случайном порядке. Результаты представлены в табл. 19 - 20. Полученные данные сравнивали с теоретическим значением $t(0,95; 18) = 2,11$.

Таблица 19. Сравнение разных партий молотого кофе "Черная карта".

	ЧК 09.10	ЧК 11.10	ЧК 03.11
ЧК 07.10	1,55	1,30	0,75
ЧК 09.10		1,35	1,28
ЧК 11.10			0,93

Результаты сравнения разных партий кофе "Черная карта" свидетельствуют об отсутствии существенных различий для партий кофе, отличающихся по дате на 8 месяцев.

Таблица 20. Сравнение образцов молотого кофе "Живой кофе" разных сортов.

	Safari Coffee 09.10	VIP A.M.
Safari Coffee 07.10	1,46	3,17
Safari Coffee 09.10		2,72

Две партии молотого кофе сорта Safari Coffee, отличающиеся по дате на 2 месяца, не различаются друг с другом, в то же время обе партии Safari Coffee отличаются от сорта VIP A.M. того же производителя, хотя и не очень значительно (значение t-критерия не намного отличаются от критического).

Таблица 21. Сравнение двух сортов молотого кофе "LavAzza".

	"LavAzza" CREMAeGUSTO
"LavAzza" Espresso	7,63

В отличие от кофе предыдущей марки два сорта кофе марки "LavAzza" различаются существенно (значение t-критерия значительно отличаются от критического).

Таблица 22. Сравнение образцов молотого кофе разных производителей.

	Сорт 2	Сорт 3	Сорт 4	Сорт 5	Сорт 6	Сорт 7	Сорт 8
Сорт 1	3,14	8,37	2,83	7,28	7,07	7,43	8,50
Сорт 2		3,91	4,37	3,43	2,72	4,68	3,88
Сорт 3			8,92	2,02	2,88	3,00	1,65
Сорт 4				7,63	7,94	7,00	8,41
Сорт 5					2,50	3,06	2,37
Сорт 6						4,08	3,30
Сорт 7							2,87

Сорт 1 – "Черная карта" 07.10; сорт 2 – "Safari Coffee" 09.10; сорт 3 – "Davidoff Café"; сорт 4 - "LavAzza" CREMAeGUSTO; сорт 5 - "LavAzza" Espresso; сорт 6 – "VIP А.М."; сорт 7 – "TURATI"; сорт 8 – "Tchibo".

Среди 28 пар сравниваемых образцов молотого кофе разных производителей имеются как очень похожие друг на друга, так и значительно различающиеся (значение t-критерия находятся в диапазоне 1,65–8,92). Две пары образцов ("Davidoff Café" – "LavAzza" Espresso и "Davidoff Café" – "Tchibo") не имеют значимых отличий по t-критерию, т.е. их можно признать идентичными. Лавацца крема существенно отличается почти от всех исследованных образцов.

Таким образом на примере трех разных образцов: зеленого чая, корвалола и молотого кофе, имеющих в своем составе вещества, принадлежащие к различным химическим классам, мы разработали и протестировали стратегию сравнительного анализа образцов сложного состава, предложенную ниже.

Стратегия сравнительного анализа сложных образцов

- Постановка задачи (задачи, решаемые с помощью предложенной стратегией).
 - 1) подтверждение тождественности образцов;
 - 2) оценка стабильности образцов во времени;
 - 3) сравнение двух или нескольких образцов или партий образцов близкого качественного состава.
- Оптимизация подготовки пробы и хроматографических условий получения "отпечатков пальцев", содержащих максимум информации, при помощи иерархической хроматографической функции ответа (HCRF).
- Оценка метрологических характеристик методики получения "отпечатков пальцев" (повторяемости и внутрилабораторной прецизионности).
- Сравнение образцов при помощи t-критерия Стьюдента.

5. ВЫВОДЫ

1. На примере зеленого чая проведено сравнение наиболее часто используемых математических критериев для решения задачи сходства и различия образцов: *коэффициента корреляции, Евклидова расстояния и t-критерия Стьюдента* и выбран наилучший из них (*t-критерий Стьюдента*).
2. На примере корвалола проведено сравнение наиболее часто используемых критериев оптимизации хроматографических условий получения "отпечатков пальцев". Выбран наилучший критерий - иерархическая хроматографическая функция ответа (HCRF).
3. С использованием HCRF проведена оптимизация подготовка пробы и хроматографических условий получения "отпечатков пальцев", содержащих максимум информации, для образцов корвалола и молотого кофе.
4. Предложена оптимизированная стратегия сравнительного анализа образцов сложного состава для решения следующих задач:
 - 1) подтверждение тождественности образцов;
 - 2) оценка стабильности образцов во времени;
 - 3) сравнение двух или нескольких образцов или партий образцов близкого качественного состава.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Daniel, K.W. Mok, Chau, F.T. Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist // *Chemometrics and intelligent laboratory systems*. - 2006. – V. 82. – P. 210-217.
2. Liang, Y., Xie P., Chan K. Quality control of herbal medicines // *J. Chromatogr. B*. – 2004. – V.812. – P. 53-70.
3. Шафигулин, Р.В., Буланова, А.В. Качественное и количественное содержание катехинов в различных сортах чая // *Сорбционные и хроматографические процессы*. - 2007. - Т. 7. - Вып.2. - С. 349-352.
4. Horie, H., Kohata, K. Analysis of tea components by high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. - 2000. – V. 881. - P. 432-435.
5. Большая Советская Энциклопедия. Кофе. – Режим доступа: <http://slovari.yandex.ru/~книги/БСЭ/Кофе/>.
6. Лекарственные средства: в 2 т. / Харьков: Торсинг; М.Д. Машковский. – Т. 1 – Изд. 13-е. – 1998. – 85с.
7. Naczka, M. Extraction and analysis of phenolics in food // *J. Chromatogr. A*. - 2004. – V. 1054. - P. 100.
8. Ronald, E. M. QuEChERS – a new sample preparation technique for multiresidue analysis of pesticides in food and agricultural samples // *LCGC*. – 2007. - May 1. - P. 2.
9. Tetsuhisa, G., Yuko, Y., Masaaki, K., Hitoshi, N. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea // *J. Chromatogr. A*. - 1996. – V. 749. - P. 297.
10. Ji, Y., Xu, Q., Hu, Y., Heyden, Y. Development, optimization and validation of a fingerprint of Ginkgo biloba extracts by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. - 2005. – V. 1066. - P. 97-104.
11. Xiong, C., Ruan, J., Tang, Y., Cai, Y., Fang, W., Zhu, Y., Zhou, D. Chromatographic Fingerprint Analysis of Macrothelypteris torresiana and Simultaneous Determination of Several Main Constituents by LC // *Chromatogr.* – 2009. - V. 70. – P. 117-124.
12. Яшин, Я.И., Яшин, А.Я. Хроматографические методы анализа химического состава чая. – Режим доступа: <http://ria-stk.ru/mos/adetail.php?ID=8134>.
13. Cui, N., Hao, H., Wang, G., Wang, W., Wang, Y. Orthogonal Design-Directed Optimization of an LC Method for Fingerprinting Mai-Luo-Ning Injection, and Validation of the Method // *Chromatogr.* – 2008. - V. 68. – P. 33-39.
14. Шафигулин, Р.В., Буланова, А.В. Хроматографический анализ флавоноидов, содержащихся в чае // *Сорбционные и хроматографические процессы*. - 2006. - Т. 6. - Вып. 5. - С. 844-849.

15. Khokhar, S., Venema, D. A RP-HPLC method for the determination of tea catechins // *J. Chromatogr. A.* - 1997. – V. 114. - P. 171-172.
16. Nishitani, E., Sagesaka, Y.M. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method // *J. Chromatogr. A.* - 2004. – V. 17. - P. 675-685.
17. Dalluge, J.J., Nelson, B.C. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* - 1998. – V. 793. - P. 273.
18. Hu, B., Wang, L., Zhou, B. Efficient procedure for isolating methylated catechins from green tea and effective simultaneous analysis of ten catechins, three purine alkaloids, and gallic acid in tea by high-performance liquid chromatography with diode array detection // *J. Chromatogr. A.* - 2009. – V. 1216. - P. 3223-3231.
19. Zhou, X., Zhang, Y., Zhao, Y., Gong, X., Zhao, C., Chen, H. An LC Fingerprint Study of *Poria cocos* (Schw.) Wolf // Режим доступа: <http://www.springerlink.com/content/b64265307458333v/fulltext.pdf>.
20. Wang, Y., Han, T., Zhang, X., Zheng, C., Rahman, K., Qin, L. LC Fingerprint and Hierarchical Cluster Analysis of *Crocus sativus* L. from Different Locations in China // *Chromatogr.* – 2009. - V. 70. – P. 143-149.
21. Lu, Y., Song, W., Liang, X., Wei, D., Zhou, X. Chemical Fingerprint and Quantitative Analysis of *Cirsium Setosum* by LC // *Chromatogr.* – 2009. - V. 70. – P. 125-131.
22. Srivastava, A., Misra, H., Verma, R., Gupta, M. Chemical Fingerprint of *Andrographis paniculata* Using HPLC, HPTLC and Densitometry // *Phytochem. Anal.* – 2004. – V. 15. – P. 280-285.
23. Zhao, Z., Dong, L., Lin, F.. Fingerprint Analysis of *Euonymus alatus* (Thunb) siebold by LC-DAD and LC-ESI-MS // *Chromatogr.* – 2009. - V. 69. – P. 429-436.
24. Neue, U. D. Theory of peak capacity in gradient elution // *J. Chromatogr. A.* - 2005. - V. 1079. - P. 153-161.
25. Gong, F., Liang, Y., Xie, P., Chau, F. Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control // *J. Chromatogr. A.* - 2003. – V. 1002. – P. 25-40.
26. Xu, S., Yang, L., Tian, R., Wang, Z., Liu, Z., Xie, P., Feng, Q. Species differentiation and quality assessment of *Radix Paeoniae Rubra* (Chi-shao) by means of high-performance liquid chromatographic fingerprint // *J. Chromatogr. A.* - 2009. – V. 1216. - P. 2163-2168.
27. Daszykowski, M., Walczak, B. Use and abuse of chemometrics in chromatography // *Trends in Analytical Chemistry.* - 2006. – V. 25. - N 11. - P. 1081-1096.

28. González, G.A. Use and misuse of supervised pattern recognition methods for interpreting compositional data. Review // *J. Chromatogr. A.* - 2007. – V. 1158. - P 215-225.
29. Xie, P., Sibao, C., Yi-Zeng, L., Wang, X., Tian, R., Upton, R. Chromatographic fingerprint analysis — a rational approach for quality assesment of traditional Chinese herbal medicine // *J. Chromatogr. A.* - 2006. – V. 1112. – P. 171-180.
30. Чубукова, И.А. Основы анализа данных. - Режим доступа: <http://www.intuit.ru/department/database/datamining/8/3.html>
31. Kai-Tai, F., Yi-Zeng, L., Xiao-Lin, Y., Chan, K., Guang-Hua, L. Critical value determination on similarity of fingerprints // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* - 2006. – V. 82. – P. 236-240.
32. Чубукова, И.А. Методы кластерного анализа. Иерархические методы - Режим доступа: <http://www.intuit.ru/department/database/datamining/13/3.html#sect4>.
33. Maesschalck, R., Jouan-Rimbaud, D., Massart, D.L. The MAhalanobis distance // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* - 2000. – V. 50. – P. 1-18.
34. Fahoome, G. Regular articles twenty nonparametric statistics and their large sample approximations // *JMASM.* - 2002. - V. 1. - N 2. - P. 248-268.
35. Орлов, И.А. Статистический анализ числовых величин - Режим доступа: <http://www.intuit.ru/department/mathematics/appstat/8/2.html>.
36. Berrueta, L.A., Alonso-Salces, R.M., Héberger, K. Supervised pattern recognition in food analysis. Review // *J. Chromatogr. A.* - 2007. – V. 1158. – P. 196-214.
37. Шарина, И.Г., Черкасов, А.В., Недоспасов, А.А. Количественные оценки степени подобия хроматограмм и фореграмм // *Журнал физической химии.* – 1994. – Т. 68. -№ 10. - С. 1752-1757.
38. Forina, M., Casale, M., Oliveri, P., Lanteri, S. CAIMAN brothers: A family of powerful classification and class modeling techniques // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* - 2009. – V. 96. – P. 239-245.
39. Forina, M., Casale, M., Oliveri, P. Complete validation for classification and class modeling procedures with selection of variables and/or with additional computed variables // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* - 2010. – V. 102. – P. 110-122.
40. Ballabio, D., Mauri, A., Todeschini, R., Buratti, S. Geographical classification of wine and olive oil by means of classification and influence matrix analysis (CAIMAN) // *Analytica Chimica Acta.* – 2006. – V. 570. – P. 249-258.
41. Todeschini, R., Ballabio, D., Consonni, V., Mauri, A., Pavan, M. CAIMAN (Classification And Influence Matrix Analysis): A new approach to the classification based on

- leverage-scaled functions // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. - 2007. – V. 87. – P. 3-17.
42. Fernandez, P.L., Martin, M.J., Gonzalez, A.G., Pablos, F. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas // *Analyst*. - 2000. – V. 125. - P. 421-425.
43. Gan, F., Ye, R. New approach on similarity analysis of chromatographic fingerprint of herbal medicine // *J. Chromatogr. A*. - 2006. – V. 1104. – P. 100-105.
44. Debeljak, Z., Srecnik, G., Madic, T., Petrovic, M., Knezevic, N., Medic-Saric, M. Evaluation of novel sample identification approach based on chromatographic fingerprint set correlation homogeneity analysis // *J. Chromatogr. A*. - 2005. – V. 1062. – P. 79-86.
45. "Хроматографические и спектральные параметры УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии" / Федеральный реестр методик выполнения измерений, применяемых в сферах распространения государственного метеорологического контроля и надзора, № ФР.1.31.2003.00951.
46. Руководству по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище (руководство Р4.1.1672-03).
47. Bronner, W.E. Method of determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. - 1998. – V. 806. - P. 137-142.