

ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ

УДК 543.544.5.068.7

ЛЕВИН М.Г.¹, МИРНЫЙ А.В.¹, ТРУТАЕВ И.В.¹, ОСТАНИНА Н.В.², ИЩЕНКО Н.В.²,
ГИНКУЛ И.Г.², ОСИПОВ А.В.³, МАРКОВ В.В.³, ЛОГИНОВА Л.П.³, БОЙЧЕНКО А.П.³

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНГУЛЯРНЫХ ЧИСЕЛ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЧИСТОТЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПИКОВ ПО ДАННЫМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ДИОДНО-МАТРИЧНЫМ ДЕТЕКТОРОМ

На основі аналізу залежностей перших десяти сингулярних чисел матриць спектрограм індопаміда з домішкою амлодіпіна, отриманих в режимі обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ОФ-ВЕРХ) з діодно-матричним детектором, встановлено кореляцію між значенням 5-го сингулярного числа та масовою часткою домішки в діапазоні від 0.01 до 0.05 %. Результати підтверджено аналізом модельних спектрограм індопаміда та амлодіпіна. Виявлений зв'язок може бути корисним при визначенні чистоти хроматографічних піків у ВЕРХ.

Ключові слова: чистота піка, високоефективна рідинна хроматографія, діодно-матричний детектор, сингулярне число, фактор чистоти, кореляція

На основании анализа зависимостей первых десяти сингулярных чисел матриц спектрограм индопамида с примесью амлодипина, полученных в режиме обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) с диодно-матричным детектором, установлена корреляция между значением 5-го сингулярного числа и массовой долей примеси в диапазоне от 0.01 до 0.05 %. Результаты подтверждены анализом модельных спектрограм индопамида и амлодипина. Установленная связь может стать полезной при определении чистоты хроматографических пиков в ВЭЖХ.

Ключевые слова: чистота пика, высокоэффективная жидкостная хроматография, диодно-матричный детектор, сингулярное число, фактор чистоты, корреляция

On the basis of the analysis of dependence of first ten singular values of spectrogram matrix of indopamid with the impurity of amlodipin, obtained in reversed-phase high-performance liquid chromatography mode (RP-HPLC) with diode-array detector, the correlation between the value of 5th singular value and mass fraction of impurity in the range from 0.01 to 0.05 % was observed. The results were proved by the analysis of simulated

spectrograms of indapamide and amlodipine. The disclosed relationship could be useful for the determination of peaks purity in HPLC.

Key words: *peak purity, HPLC, diode-array detector, singular value, purity factor, correlation*

Введение

Определение чистоты хроматографических пиков является важным параметром валидации методик в фармацевтическом анализе [1]. Наиболее распространенным методом определения чистоты хроматографических пиков сегодня является использование диодно-матричного детектора, который позволяет получать трехмерную спектрограмму, представляющую собой зависимость поглощения от длины волны и времени хроматографирования. Однако, если содержание примеси составляет менее 1 %, спектр примеси близок к спектру основного компонента, а разделение пиков недостаточное, доказательство чистоты пика является достаточно сложной задачей [2]. Кроме того, при низком содержании примеси на ее выявление значительное влияние оказывает инструментальный шум, обусловленный дрейфом измерений оптической плотности, нестабильностью скорости подвижной фазы и т.д.

Подходы к определению чистоты пика можно разделить на две основные группы: I) физическое перенесение пика в другую хроматографическую систему с отличающимся механизмом разделения; II) использование математических методов для оценки чистоты пика. Последние делятся на инструментальные и хемометрические подходы.

Инструментальные подходы основаны на использовании возможности сопоставления спектров, полученных в ходе хроматографирования со спектрами стандартов или друг с другом. В самом простом случае, когда спектры основного вещества и примеси известны и отличаются, для определения чистоты пика достаточно провести визуальное сравнение полученных в ходе хроматографирования спектров со спектрами не содержащего примесей основного компонента и спектром примеси. Однако такой метод не подходит при разработке новых методик хроматографического анализа, когда структура и свойства примеси неизвестны. Более универсальный метод основан на сравнении спектров, полученных от начала до конца элюирования пика. Очевидно, что если пик не содержит примесей, то такие спектры должны быть практически идентичны. Проблемой при таком сравнении является установление критериев наличия и отсутствия примеси, которые, очевидно, зависят от схожести спектров примеси и основного компонента, содержания примеси, степени разделения. В настоящее время методом, который получил количественную характеристику, является сравнение спектров, полученных в ходе хроматографирования с известным спектром чистого основного вещества, средним спектром на хроматограмме или спектрами, снятыми у хвоста или в начале хроматографического пика [3]. Этот метод оценки чистоты пика реализован во многих коммерческих программных продуктах, например Agilent ChemStation [3] и Chromeleon [4], и будет описан подробнее ниже. К сожалению, использование инструментальных методов позволяет лишь подтвердить наличие примеси в пике, однако не позволяет утверждать, что пик является чистым.

Хемометрические подходы основаны на использовании математических методов для преобразования матрицы исходных данных и извлечения из нее необходимой информации. Чаще всего используют анализ главных компонент, который позволяет уменьшить размерность исходных данных без потери информации, содержащейся в исходной матрице. Однако непосредственное применение анализа главных компонент ко всей спектрограмме с последующим анализом значимости каждой компоненты или графиков проекций компонент часто позволяет выявить примесь только на уровне выше 1 %. Поэтому в литературе предложен целый ряд алгоритмов применения анализа

главных компонент для определения чистоты пика, которые позволяют снизить предел обнаружения примеси в пике основного вещества. Так, например, использует последовательный расчет сингулярных значений матрицы спектрограммы с фиксированным количеством временных точек и постепенным продвижением вдоль пика, после чего рассматривают зависимость первого и второго сингулярного значения от времени (evolving factor analysis) [5-11]. Другим методом является итерационный анализ изменений (iterative target transformation factor analysis), который, однако, мало используется в последнее время для определения чистоты пиков [12-16].

Анализируя известные хемометрические подходы можно сделать вывод о том, что они базируются чаще всего на анализе зависимости первых двух сингулярных значений. Так как априорно предполагается, что число значимых главных компонент или сингулярных значений должно соответствовать числу компонентов в исследуемом пике.

В этой работе предложен новый подход к определению чистоты пика на основании анализа не только первых, но и ряда последующих сингулярных чисел, которые, как правило, в литературе считаются незначимыми. Подход протестирован на экспериментальных данных по ВЭЖХ разделению индопамида и амлодипина безилата, а также на симулированных двухкомпонентных хроматограммах этих же веществ.

Экспериментальная часть

Аппаратура и условия хроматографирования

В работе использовали жидкостный хроматограф Agilent 1100 3D LC System с насосом G1311A, автосамплером G1329A, термостатом автосамплера G1330B, диодно-матричным спектрофотометрическим детектором G1315B, термостатом колонки G1316A и дегазатором G1322A. Разделения проводили на колонке Zorbax Eclipse XDB-C8 4.6x150 mm, 5 μ m (Agilent Technologies). Объем вводимой пробы составлял 10 мкл; скорость подвижной фазы для всех разделений 1.5 мл/мин; температура колонки 45 °С. Подвижная фаза: буферный раствор (рН 4.60): ацетонитрил (70:30 по объему). Детектирование проводили в диапазоне от 200 до 400 нм с шагом 2 нм. Для приготовления растворов использовали дистиллированную воду, с последующей подготовкой при помощи системы очистки воды EASYPure II RF/UV.

Реагенты и растворы

Исходные растворы индапамида (Ph. Eur. monograph 1108, Laboratory Alchemica, s.r.l, Италия) и амлодипина (Ph. Eur. monograph 1491, Glochem Industry Ltd., Индия) с концентрацией 1 мг/мл (A0, I0) готовили в ацетонитриле (Lab-Scan, HPLC Grade) по рассчитанной навеске.

Промежуточный рабочий раствор с концентрацией 0.01 мг/мл амлодипина и 0.99 мг/мл индопамида готовили волюмометрически из исходного раствора.

Рабочие растворы амлодипина и индопамида, готовили, помещая 1, 2, 3 или 5 мл промежуточного рабочего раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл, после чего доводили раствор до метки исходным раствором индопамида. Таким образом, концентрация амлодипина в рабочих растворах составляла $1.0 \cdot 10^{-4}$, $2.0 \cdot 10^{-4}$, $3.0 \cdot 10^{-4}$ $5.0 \cdot 10^{-4}$ мг/мл, а концентрация индопамида 9.999, 9.998, 9.997, 9.995 мг/мл соответственно. Далее рабочие раствора с массовой долей амлодипина 0.01, 0.02, 0.03 и 0.05 % относительно общей массы амлодипина и индопамида в растворе обозначаются как AM_{0.01} AM_{0.02} AM_{0.03} AM_{0.05}.

План проведения эксперимента

Исходный раствор индопамида, не содержащий амлодипина ($AM_{0.00}$), а также рабочие растворы хроматографировали последовательно. После хроматографирования раствора $AM_{0.05}$ проводили хроматографирование чистого ацетонитрила в тех же условиях после чего повторяли хроматографирование всех растворов. Всего было получено 5 спектрограмм для каждого раствора, которые использовались для оценки схожести результатов.

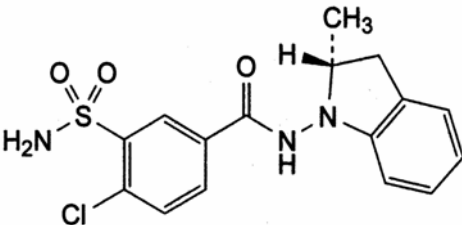
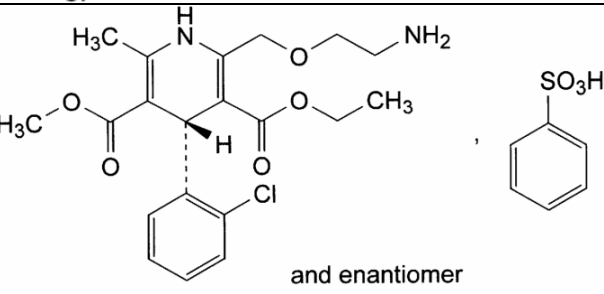
Результаты и обсуждение

Амлодипин и индопамид: свойства и особенности разделения

В табл. 1 представлены графические формулы амлодипина и индопамида, а также параметры их гидрофобности, выраженные как коэффициенты распределения в системе 1-октанол-вода ($\log K_{ow}$) и показатели констант диссоциации (pK_a) рассчитанные при помощи программы ACD Labs 4.0. Оба вещества имеют хиральный центр и являются смесью двух энантиомеров.

Таблица 1.

Графические формулы и свойства разделяемых веществ.

Индопамид $\log K_{ow} = 2.1$ (расч.) $pK_a (NH^+) = 9.12$ (расч.) $pK_a (NH_2) = 10.65$ (расч.)	 and enantiomer
Амлодипин безилат $\log K_{ow} = 3.7$ (расч. для амлодипина) $\log K_{ow} = 0.85$ (расч. для бензолсульфоновой кислоты) $pK_a (NH_2^+) = 3.13$ (расч. для амлодипина) $pK_a (NH_3^+) = 8.73$ (расч. для амлодипина)	 and enantiomer

В соответствии с представленными в таблице данными при pH меньше 7, преобладающей формой в растворе амлодипина и индопамида являются катионы; бензолсульфоновая кислота находится в диссоциированной форме. В соответствии с гидрофобностью разделяемые вещества можно выстроить в следующую последовательность: бензолсульфоновая кислота < индопамид < амлодипин. При разделении лекарственных препаратов оказалось, что бензолсульфоновая кислота имеет малое время удерживания, а амлодипин и индопамид удерживаются сильнее (рис. 1). Условия разделения амлодипина специально не оптимизировались, поэтому его пик имел неправильную форму. Пики амлодипина и индопамида в выбранных условиях разделения перекрываются, что и использовалось в дальнейшем для изучения возможности

определения чистоты пика индопамида при содержании примеси амлодипина от 0.01 % до 0.05 % по массе.

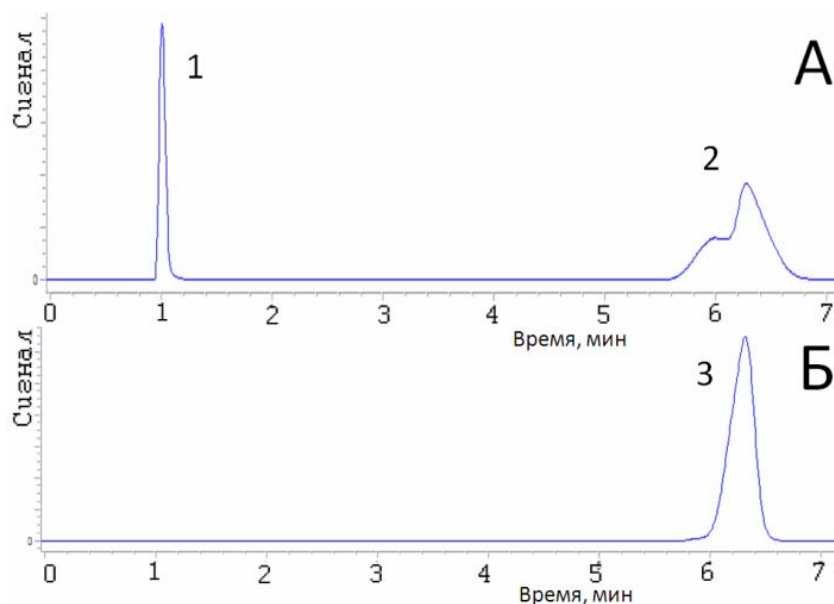


Рис. 1. Хроматограмма разделения амлодипина безилата (А) и индопамида (Б)
1 – бензолсульфоновая кислота, 2 – амлодипин, 3 – индопамид.

На рис. 2 приведены спектры амлодипина и индопамида, полученные в потоке подвижной фазы. Оба вещества имеют максимумы поглощения в УФ области. При длине волны больше 260 нм спектры различаются, однако, поглощение амлодипина и индопамида в этой области низкое.

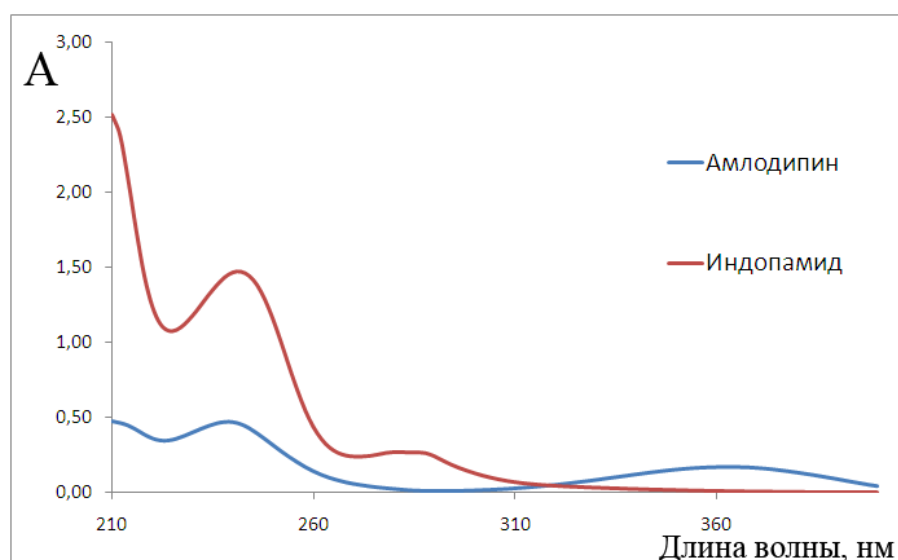


Рис. 2. Спектры поглощения амлодипина и индопамида, снятые в потоке подвижной фазы.

Близость времен удерживания амлодипина и индопамида, а также незначительные различия в их спектрах не позволяют визуально оценить наличие примеси амлодипина в индопамиде даже на уровне 1 % (по массе). Так на рис. 3А визуально невозможно

определить наличие максимуму поглощения амплодипина при 360 нм, который, однако, отчетливо проявляется на спектрограмме чистого амплодипина (рис. 3Б).

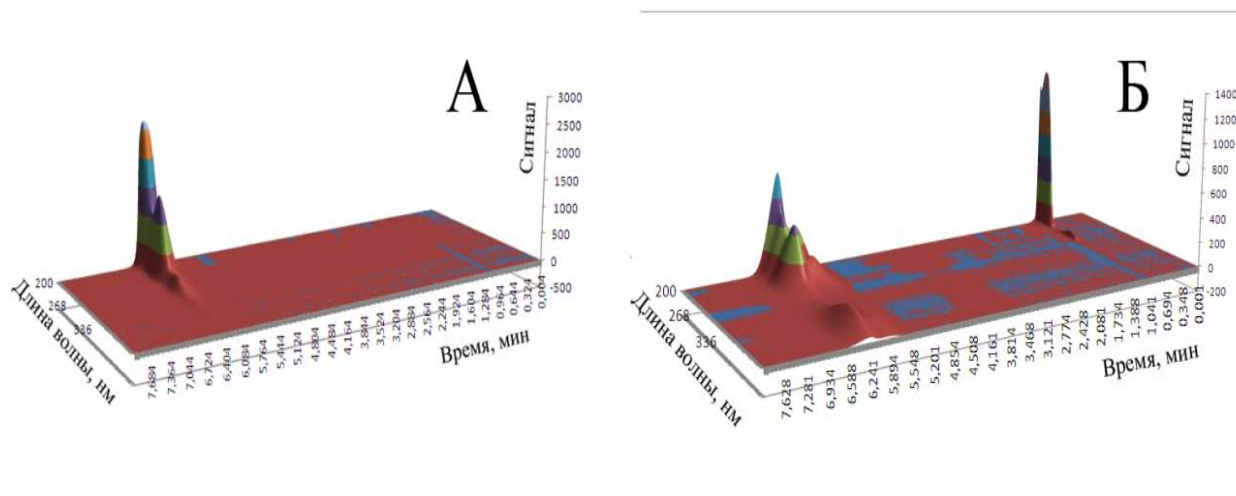


Рис. 3. Спектрограммы (А) смеси амплодипина (1 % по массе) и индопамида (99 % по массе); (Б) индопамида.

Использование фактора чистоты и сингулярных чисел для определения чистоты пика индопамида

Фактор чистоты пика (*PF*) рассчитывался посредством коммерчески доступного программного обеспечения ChemStation фирмы Agilent Technologies. Для расчетов использовали область длин волн от 250 до 400 нм, и время от 5.32 до 7.72 мин. Фактор чистоты рассчитывается ChemStation на основе факторов подобия (similarity factors (*SF*)) двух спектров:

$$SF = 1000 \times r^2,$$

где:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (A_i - A_{cp}) \times (B_i - B_{cp})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{i=n} (A_i - A_{cp})^2 \times \sum_{i=1}^{i=n} (B_i - B_{cp})^2}}$$

В качестве одного из спектров, выбирается специальным образом усредненный по временному диапазону пика спектр, в качестве другого, выступают те спектры, которые отвечают определенному критерию. Значения *SF* для выбранных спектров усредняются, и эта величина дает *PF* [3].

Таблица 2.

Факторы чистоты, рассчитанные при помощи программы ChemStation (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

№	Содержание примеси амлодипина в индопамиде в % (по массе)				
	0	0.01	0.02	0.03	0.05
1	999.971	999.946	999.866	999.81	999.586
2	999.962	999.966	999.838	999.911	999.640
3	999.965	999.971	999.716	999.744	999.601
4	999.982	999.933	999.843	999.776	999.664
5	999.976	999.927	999.807	999.763	999.668
Среднее значение, \bar{x}	999.9712	999.9486	999.814	999.8008	999.6318
Относительное стандартное отклонение, $s/\bar{x} * 100\%$	0.000811	0.00195	0.005869	0.006615	0.003696
$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$ $t_{0.05, 4} = 2.78$	999.971±0,010	999.94±0,02	999.81±0,07	999.80±0,08	999.63±0,05

Оказалось, что фактор чистоты уменьшается с увеличением содержания примеси амлодипина, однако, при этом возрастает и неопределенность рассчитанных значений *PF* (табл. 2).

В табл. 3 приведены рассчитанные на основании матрицы данных, соответствующей времени хроматографирования от 5.328 до 7.328 мин и диапазону длин волн от 250 до 400 нм, значения первых 10 сингулярных чисел.

Таблица 3.

Первые 10 сингулярных чисел матрицы спектрограммы, соответствующей времени хроматографирования от 5.328 до 7.328 мин и диапазону длин волн от 250 до 400 нм

№	1	2	3	4	5	$\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$; $t_{0.05, 4} = 2.78$
Содержание амлодипина 0.00% (по массе)						
1	12370	12350	12370	12360	12350	12360±12
2	24.732	24.625	23.45	22.812	22.636	23.7±1.2
3	7.844	7.615	6.294	6.156	7.318	7.0±0.9
4	6.063	6.055	4.513	2.432	2.964	4±2
5	0.805	0.838	0.941	0.837	0.693	0.82±11
6	0.566	0.592	0.596	0.62	0.665	0.61±0.5
7	0.526	0.546	0.528	0.533	0.543	0.54±0.01
8	0.506	0.509	0.526	0.529	0.532	0.52±0.01
9	0.484	0.483	0.488	0.476	0.504	0.48±0.01
10	0.474	0.461	0.459	0.474	0.481	0.46±0.01

Содержание амлодипина 0.01% (по массе)						
1	12270	12290	12270	12250	12280	12272±18
2	24.724	26.316	23.147	22.284	22.897	23±2
3	7.433	10.04	6.271	7.198	6.917	7.6±1.8
4	6.024	5.66	3.337	2.446	3.043	4±2
5	1.042	1.031	1.322	0.918	0.922	1.1±0.2
6	0.65	0.587	0.632	0.751	0.717	0.67±0.08
7	0.567	0.542	0.532	0.582	0.6	0.56±0.04
8	0.543	0.524	0.522	0.522	0.53	0.52±0.01
9	0.529	0.51	0.501	0.478	0.506	0.50±0.02
10	0.474	0.46	0.475	0.47	0.484	0.47±0.01
Содержание амлодипина 0.02% (по массе)						
1	12280	12320	12330	12280	12320	12306±30
2	24.474	23.542	22.793	22.155	23.079	23.2±1.1
3	7.707	7.205	9.406	7.81	6.834	7.8±1.2
4	5.857	5.019	4.056	3.493	2.566	4.2±1.6
5	1.248	1.48	1.136	0.933	1.113	1.2±0.3
6	0.668	0.665	0.793	0.816	0.659	0.72±0.10
7	0.535	0.589	0.604	0.613	0.596	0.59±0.04
8	0.526	0.502	0.546	0.544	0.537	0.53±0.02
9	0.502	0.496	0.529	0.517	0.527	0.51±0.02
10	0.494	0.48	0.484	0.496	0.468	0.48±0.01
Содержание амлодипина 0.03% (по массе)						
1	12210	12300	12260	12260	12260	12258±40
2	25.876	23.372	22.972	22.124	22.73	23.4±1.8
3	10.47	7.299	6.91	9.061	7.015	8.2±1.9
4	5.717	4.558	3.125	3.687	3.142	4.1±1.4
5	1.174	1.995	1.838	1.063	1.204	1.5±0.5
6	0.623	0.615	0.69	0.801	0.778	0.70±0.11
7	0.591	0.558	0.537	0.554	0.638	0.58±0.05
8	0.512	0.522	0.519	0.532	0.568	0.53±0.03
9	0.504	0.519	0.483	0.496	0.549	0.51±0.03
10	0.481	0.485	0.461	0.465	0.512	0.48±0.03
Содержание амлодипина 0.05% (по массе)						
1	12250	12300	12270	12260	12200	12256±45
2	23.473	23.438	23.172	22.625	22.023	22.9±0.8
3	7.478	8.547	7.307	8.01	7.902	7.8±0.6
4	5.771	4.521	2.958	3.717	3.569	4.1±1.4
5	2.568	2.517	2.023	1.286	1.337	1.9±0.8
6	0.662	0.764	0.72	0.734	0.691	0.71±0.05
7	0.609	0.655	0.586	0.614	0.527	0.60±0.06
8	0.518	0.606	0.515	0.523	0.509	0.53±0.05
9	0.488	0.591	0.478	0.511	0.485	0.51±0.06
10	0.462	0.517	0.463	0.485	0.481	0.48±0.03

Анализ зависимостей средних значений сингулярных чисел от массовой доли амлодипина показал, что первое, второе и четвертое сингулярное число уменьшаются с увеличением массовой доли амлодипина; третье, пятое, шестое и седьмое – растут. Седьмое, восьмое и девятое сингулярные числа остаются практически без изменений (рис. 4). Закономерный рост наблюдается только для пятого сингулярного числа.

Интересно, что такое поведение не согласуется с общепринятым представлением, что значимые сингулярные числа в порядке убывания должны соответствовать значимым компонентам в смеси. Уменьшение второго сингулярного числа с увеличением доли амлодипина подтверждает это наблюдение. Рост пятого сингулярного числа, возможно, связан с тем, что при малом содержании примеси ее поведение описывается меньшими сингулярными числами, а не сливается с фоном. Это наблюдение положено нами как основу для хемометрического определения чистоты хроматографического пика. Детальный анализ закономерностей изменения малых сингулярных чисел будет проведен позднее.

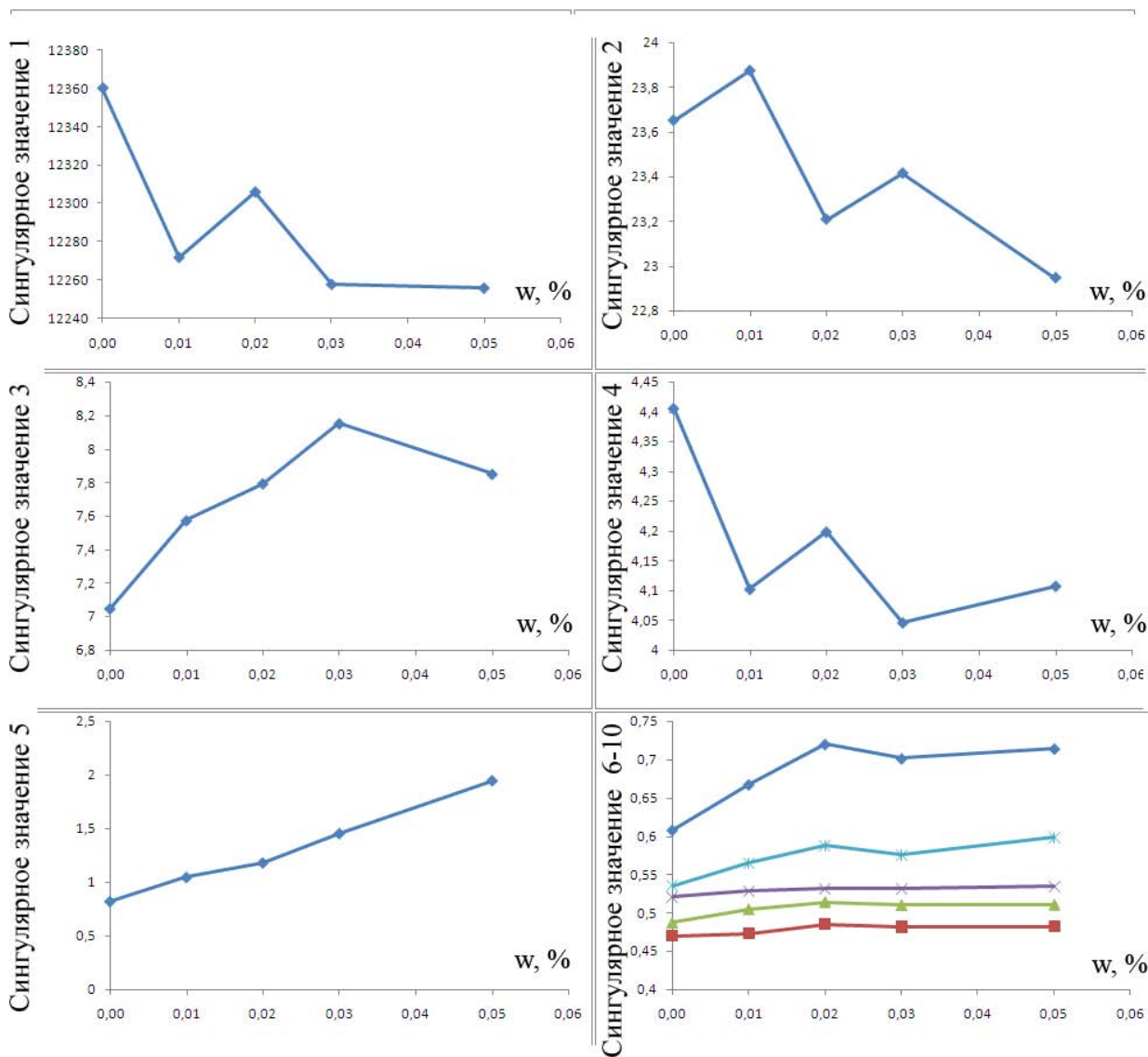


Рис. 4. Зависимость средних значений десяти сингулярных чисел матрицы спектрограммы, соответствующей времени хроматографирования от 5.328 до 7.328 мин и диапазону длин волн от 250 до 400 нм

Необходимо также отметить, что в отличие от третьего и четвертого сингулярного числа, пятое сингулярное число рассчитывается с малой неопределенностью (табл. 2). Как следствие, рост значения пятого сингулярного числа с увеличением массовой доли амлодипина является значимым.

Аналогично корреляции между сингулярными числами и массовой долей примеси можно построить корреляции между фактором чистоты пика и другими, связанными с этой характеристикой величинами, и массовой долей примеси. Ниже приведены зависимости нормализованных на минимальное значение величин ($1000-PF$) и пятого сингулярного числа ($SV5$) от массовой доли амлодипина:

$$SV5_{\text{норм.}} = 0.97(0.04) + 27.2(1.4)w; \quad R^2 = 0.991$$

$$(1000 - PF)_{\text{норм.}} = 0.5(0.8) + 241(28)w; \quad R^2 = 0.96$$

Обе зависимости достаточно хорошо описываются прямыми. Хотя в случае использования критерия ($1000-PF$) чувствительность выше, чем для хемометрического критерия, качество описания выше в последнем случае.

Применение хемометрического подхода для оценки чистоты пика на модельных спектрограммах

Для тестирования предложенного подхода на основании спектрограммах чистого индопамида и амлодипина были смоделированы хроматограммы индопамида с примесью амлодипина на уровне 0.01, 0.02, 0.03 и 0.05 %. Для полученных модельных хроматограмм были рассчитаны значения сингулярных чисел, которые представлены в табл. 5.

Таблица 5.

Средние значения сингулярных чисел для модельных спектрограмм с различной долей примеси амлодипина в индопамиде

№	Средние значения сингулярных чисел				
	0.00	0.01	0.02	0.03	0.05
1	12370	12360	12360	12360	12360
2	24.732	24.751	24.77	24.79	24.831
3	7.844	7.791	7.742	7.698	7.624
4	6.063	6.099	6.137	6.174	6.25
5	0.805	0.847	0.902	0.967	1.126
6	0.566	0.564	0.565	0.573	0.594
7	0.526	0.53	0.54	0.546	0.548
8	0.506	0.513	0.515	0.515	0.514
9	0.484	0.49	0.492	0.493	0.493
10	0.474	0.475	0.475	0.475	0.475

Как видно из таблицы 5-ое сингулярное число растет линейно с увеличением доли примеси, что согласуется с экспериментальными данными, представленными выше.

Выводы

Таким образом, в работе предложен альтернативный хемометрический подход к оценке чистоты хроматографических пиков, который основан на анализе зависимостей малых сингулярных чисел матрицы, соответствующей спектрограмме исследуемого пика. Установлено, что в случае наличия примеси амлодипина в индопамиде на уровне 0.01 –

0.05% наблюдается линейная зависимость между значением пятого сингулярного числа и величиной, рассчитанной на основании значения фактора чистоты от массовой доли примеси. Исследование сингулярных чисел спектрограмм может стать полезной альтернативой при определении чистоты пика с использованием диодно-матричного детектора и требует дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. ICH, Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH harmonised tripartite guideline. 2005, Q2(R1): International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.- p. 17.
2. **Duarte A.C., Capelo S.** Application of chemometrics in separation science // Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. - 2006. - Vol. 29, No. (7-8). - P. 1143-1176.
3. **Stahl M.** Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology // Agilent Technologies. - 2003. - P. 1-16.
4. User's Guide to Chromeleon. Version 6.11 // Dionex, Sunnyvale. - 2000.
5. **Keller H.R., Massart D.L., Liang Y.Z., Kvalheim O.M.** Evolving factor analysis in the presence of heteroscedastic noise // Analytica Chimica Acta. - 1992. - Vol. 263, No. (1-2). - P. 29-36.
6. **Ritter C., Gilliard J.A., Cumps J., Tilquin B.** Corrections for heteroscedasticity in window evolving factor analysis // Analytica Chimica Acta. - 1996. - Vol. 318, No. (2). - P. 125-136.
7. **Keller H.R., Massart D.L., De Beer J.O.** Window evolving factor analysis for assessment of peak homogeneity in liquid chromatography // Analytical Chemistry. - 1993. - Vol. 65, No. (4). - P. 471-475.
8. **Kvalheim O.M., Liang Y.Z.** Heuristic evolving latent projections: Resolving two-way multicomponent data. 1. Selectivity, latent-projective graph, datascope, local rank, and unique resolution // Analytical Chemistry - 1992. - Vol. 64, No. (8). - P. 936-946.
9. **Liang Y.Z., Kvalheim O.M., Keller H.R., Massart D.L., Kiechle P., Erni F.** Heuristic evolving latent projections: Resolving two-way multicomponent data. 2. Detection and resolution of minor constituents // Analytical Chemistry. - 1992. - Vol. 64, No. (8). - P. 946-953.
10. **Maeder M.** Evolving factor analysis for the resolution of overlapping chromatographic peaks // Analytical Chemistry. - 1987. - Vol. 59, No. (3). - P. 527-530.
11. **Keller H.R., Massart D.L.** Evolving factor analysis // Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. - 1992. - Vol. 12, No. (3). - P. 209-224.
12. **Vandeginste B.G.M., Derks W., Kateman G.** Multicomponent self-modelling curve resolution in high-performance liquid chromatography by iterative target transformation analysis // Analytica Chimica Acta. - 1985. - Vol. 173, No. (C). - P. 253-264.
13. **Vandeginste B.G.M., Kateman G., Strasters J.K., Billiet H.A.H., de Galan L.** Data handling in HPLC-diode array UV-spectrometry // Chromatographia. - 1987. - Vol. 24, No. (1). - P. 127-134.
14. **Strasters J.K., Billiet H.A.H., De Galan L., Vandeginste B.G.M., Kateman G.** Reliability of iterative target transformation factor analysis when using multiwavelength detection for peak tracking in liquid chromatographic separations // Analytical Chemistry. - 1988. - Vol. 60, No. (24). - P. 2745-2751.
15. **Naish P.J., Lynch R.J., Blaffert T.** A study of the practical limitations of principal components analysis and the labelling of unresolved HPLC peaks // Chromatographia. - 1989. - Vol. 27, No. (7-8). - P. 343-358.

16. **Strasters J.K., Billiet H.A.H., De Galan L., Vandeginste B.G.M.** Strategy for peak tracking in liquid chromatography on the basis of a multivariate analysis of spectral data // Journal of Chromatography. - 1990. - Vol. 499. - P. 499-522.

¹ *Отдел развития, ОАО "Химфармзавод "Красная Звезда", ул. Гордиенковская, 1, Харьков*

² *Лаборатория контроля качества продукции, Государственное Учреждение "Институт гигиены и медицинской экологии им. А.Н. Марзеева АМН Украины. Киев*

³ *Кафедра химической метрологии, Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы.*

Надійшло до редакції 25.01.2011