

КРАТКИЕ НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 543.544.3

*Д. В. Прокофьев, И. Г. Зенкевич***КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
МЕТОДОМ АБСОЛЮТНОЙ ГРАДУИРОВКИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО СТАНДАРТА**Санкт-Петербургский государственный университет,
Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

Точность количественного хроматографического анализа методом абсолютной градуировки определяется воспроизводимостью абсолютных площадей (высот) пиков аналита. Их разброс, в основном связанный с потерями проб на стадии дозирования, может приводить к возрастанию ошибок определений. Для решения данной проблемы продемонстрированы возможности использования дополнительного стандарта в методе абсолютной градуировки. Предлагаемый вариант основан на введении в градуировочные растворы и целевой образец дополнительного стандарта и замене абсолютных площадей относительными величинами аналит/дополнительный стандарт. При этом на химические свойства дополнительного стандарта нет никаких ограничений. Такой вариант позволяет увеличить прецизионность (уменьшить случайную погрешность) результатов, сократить число параллельных определений и не приводит к существенному усложнению процедуры анализа. Библиогр. 10 назв. Ил. 3. Табл. 3.

Ключевые слова: хроматографический анализ, абсолютная градуировка, дополнительный стандарт, повышение точности определений.

*D. V. Prokofev, I. G. Zenkevich***CHROMATOGRAPHIC QUANTITATION BY ABSOLUTE
CALIBRATION USING AN ADDITIONAL STANDARD**

St. Petersburg State University, 7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

Precision of quantitative chromatographic analysis using absolute calibration is determined by the reproducibility of absolute areas (heights) of analyte peaks. Their dispersion, mainly associated with losses on samples during injection, lead to an insufficient accuracy of quantitation. Solving this problem implies using an additional standard for absolute calibration. The proposed version is based on introducing of an additional standard to calibration and target samples and on the replacement of absolute peak areas with relative values, namely $S(\text{analyte}) / S(\text{additional standard})$. It is noteworthy there are no restrictions on the chemical origin of the additional standard. In this case, the mode proposed allows increasing precision (reduce random errors) of results, as well as reducing the number of replicates to achieve a required accuracy. Furthermore, there is no significant complication of the analytical procedure as a whole. Refs 10. Figs 3. Tables 3.

Keywords: chromatographic analysis, absolute calibration, additional standard, increasing the precision of determinations.

Введение. Количественный хроматографический анализ методом абсолютной градуировки предполагает предварительную градуировку прибора по серии заранее приготовленных растворов с различными концентрациями аналитов с целью нахождения градуировочной зависимости между площадями (S) хроматографических пиков (реже высотами) и содержанием определяемых компонентов в образцах [1]. Полученное в результате этого математическое соотношение (уравнение регрессии) применимо для анализа однотипных образцов с неизвестным содержанием этих компонентов. При этом метод наименьших квадратов (МНК) [1, 2] является наиболее распространённым способом вычисления параметров линейных регрессионных уравнений вида

$$C = aS + b, \quad (1)$$

где C — концентрация аналита в пробе; S — площадь хроматографического пика аналита.

Точность «классического» метода абсолютной градуировки требует максимальной воспроизводимости количественных параметров пиков определяемых аналитов, так как параметры регрессии вычисляются на основе принципа минимума суммы квадратов отклонений экспериментальных значений от их оценок выбранной функцией, и она тем точнее описывает изучаемую линейную зависимость, чем лучше экспериментальные точки выстраиваются в прямую [1, 2].

В хроматографии наибольший вклад в дисперсию количественных параметров пиков вносят неконтролируемые потери проб на стадии их дозирования в испаритель хроматографа [3], возникающие в основном из-за «человеческого фактора» и изношенности дозирующего оборудования. При этом потери могут приводить к неприемлемо высоким для количественного анализа относительным стандартным отклонениям результатов [4]. Точность существующего метода абсолютной градуировки можно увеличить, если ввести в целевые образцы и градуировочные растворы дополнительный стандарт, т. е. использовать отношения параметров пиков целевых компонентов к параметрам пиков дополнительных стандартов вместо абсолютных величин количественных параметров.

В литературе можно найти немногочисленные примеры использования дополнительных стандартов и отношений площадей пиков аналит/дополнительный стандарт для компенсации неконтролируемых вариаций аналитического сигнала целевых компонентов пробы, в частности статьи [5–7] и обзор [8]. При этом в качестве дополнительных стандартов использовали соединения, максимально близкие по своей химической природе к аналитам. Принципиальным отличием предлагаемого нами варианта является отсутствие каких-либо ограничений на химическую природу дополнительного стандарта. От него требуется лишь возможность детектирования и хроматографическое разделение с аналитом.

Настоящая статья посвящена рассмотрению варианта абсолютной градуировки с использованием дополнительного стандарта и возможностям этого способа для компенсации разброса количественных параметров пиков.

Экспериментальная часть.

Приготовление модельных образцов. Модельные образцы готовили объёмно-объёмным способом. Они представляли собой растворы двух компонентов в 2-пропаноле (Вектон, Санкт-Петербург). При этом один из компонентов условно принимали за аналит, а второй — за дополнительный стандарт. В качестве аналитов использовали

анизол, бутилацетат и ацетофенон, а дополнительных стандартов — 1-гептанол, изопропилбутират и бутилбутират. Все соединения имели квалификацию х. ч. для хроматографии. Концентрации аналитов и дополнительных стандартов пересчитывали в массовые единицы (мг/мл) с учётом их плотностей при комнатной температуре.

Аппаратура и программное обеспечение. Для дозирования растворителя при приготовлении модельных образцов использовали механический шприц «Biohit Proline Plus» переменного объёма (1–10 мл), а компонентов (аналит и дополнительный стандарт) — электронный шприц «eVol XR» (SGE Analytical Science) с дозирующими иглами различного объёма (50, 100, 500 мкл). Хроматографический анализ модельных образцов проводили на газовом хроматографе «Кристалл 5000.2» с пламенно-ионизационным детектором и колонками: ВРХ-1 (длина 10 м, внутренний диаметр 0,53 мм, толщина плёнки неподвижной фазы 2,65 мкм) и ОРТМА-1 (длина 25 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина плёнки неподвижной фазы 0,35 мкм). Для дозирования образцов в испаритель хроматографа использовали шприц «Газохром-101» объёмом 1 мкл; объём дозируемых проб составлял 0,5 мкл.

Для расчёта площадей хроматографических пиков применяли программное обеспечение «Хроматэк-Аналитик 2.6», статистическую обработку данных производили в «OriginPro 2015», а построение графиков — в «Excel» (Microsoft Office 2010).

Условия хроматографического анализа. В качестве газа-носителя для хроматографического анализа использовали азот, режим анализа подбирали для каждой пары «аналит — дополнительный стандарт» с целью наилучшего хроматографического разрешения:

анизол—1-гептанол; бутилацетат—изопропилбутират: изотерма 130°C, объёмная скорость азота 4 мл/мин (линейная скорость 40 см/сек), деление потока 1 : 5, температура испарителя — 150°C, температура детектора 200°C;

ацетофенон—бутилбутират: программирование температуры: 90°C, 8°C/мин, 146°C, 54°C/мин, 200°C, объёмная скорость азота 1,5 мл/мин (линейная скорость 30 см/сек), деление потока 1 : 10, температура испарителя и детектора 200°C.

Обсуждение результатов. Результаты построения градуировочных функций для модельных образцов: бутилацетат—изопропилбутират и ацетофенон—бутилбутират для «классической» схемы абсолютной градуировки приведены в табл. 1; соответствующие им градуировочные графики иллюстрирует рис. 1. Использование логарифмической шкалы во втором случае связано с большим диапазоном концентраций (четыре порядка).

Таблица 1

Параметры линейных градуировочных зависимостей, соответствующих «классическому» методу абсолютной градуировки (1)

Аналит	Число аппроксимируемых точек	Диапазон концентраций, мг/мл	r	Параметры уравнения
Бутилацетат	30	$8 \cdot 10^{-4}$ –8	0,992	$a = (4,86 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$; $b = -2,5 \pm 1,1$
Ацетофенон	25	4–133	0,97	$a = 1,26 \pm 0,04$; $b = -4,67 \pm 0,14$

Обращает на себя внимание, что градуировочные графики на рисунке иллюстрируют заметный разброс по площадям пиков для одних и тех же стандартных растворов,

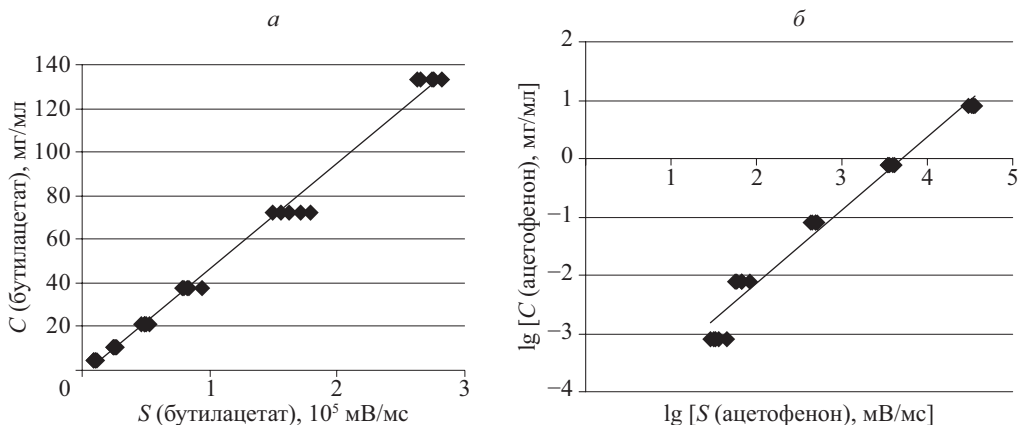


Рис. 1. Градуировочные графики модельных образцов
бутилацетат—изопропилбутират (а), ацетофенон—бутилбутират (б),
построенные по «классическому» методу абсолютной градуировки

что в свою очередь приводит к уменьшению коэффициентов корреляции (r) градуировочных зависимостей.

В основе рассматриваемого нами варианта абсолютной градуировки лежит тот факт, что отношения площадей (высот) хроматографических пиков двух компонентов подвержены существенно меньшим вариациям, чем измерения их абсолютных значений для каждого соединения. Справедливость этого утверждения проиллюстрирована в статье [4], а также на рис. 2, где представлены случайные составляющие погрешностей площадей хроматографических пиков в виде: «относительное стандартное отклонение площади бутилацетата (δS) — концентрация (C) бутилацетата в градуировочном растворе» для классического метода абсолютной градуировки и « δS отношения бутилацетат/изопропилбутират — концентрация бутилацетата» для модифицированного варианта.

Предлагаемый нами подход требует соответствующей модификации расчётного уравнения, т. е. замены абсолютных площадей их отношениями к дополнительному

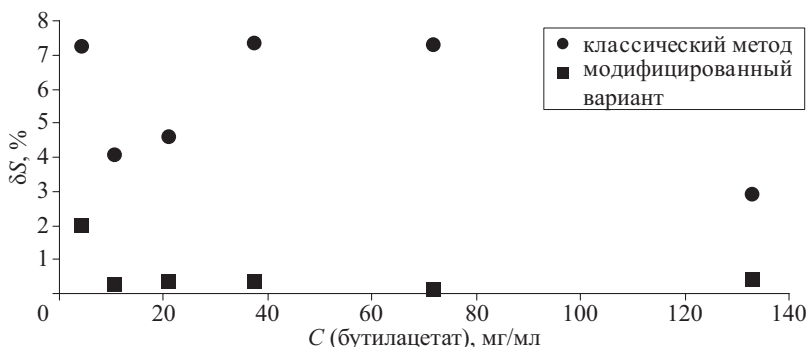


Рис. 2. Зависимости случайных составляющих погрешностей площадей хроматографических пиков δS (бутилацетат) — C (бутилацетат) для «классического» метода абсолютной градуировки и δS (бутилацетат/изопропилбутират) — C (бутилацетат) для модифицированного варианта

стандарту. Таким образом, модифицированное уравнение линейной градуировочной зависимости выглядит следующим образом:

$$C = a'(S/S_{\text{доп. ст.}})k + b', \quad (2)$$

где C — концентрация аналита в пробе; $S/S_{\text{доп. ст.}}$ — отношение площадей пиков аналита и дополнительного стандарта; a' и b' — вычисляемые МНК параметры линейного уравнения.

Важно, что содержание дополнительного стандарта в градуировочных растворах и целевых образцах должно быть максимально близким. Если же метод абсолютной градуировки используют в большом интервале концентраций, то необходимо соблюдать другое правило: концентрация дополнительного стандарта в анализируемом образце должна быть близка к концентрации аналита [5, с. 360; 9; 10]. Это обуславливает появление коэффициента пропорциональности k в градуировочном уравнении (2), расчёт которого проводят для отношений площадей «аналит — дополнительный стандарт», соответствующих каждому градуировочному раствору. Смысл k состоит в согласовании концентраций дополнительного стандарта в различных градуировочных растворах, поэтому он может быть выражен отношениями разных величин, в том числе концентраций или объёмов добавленного в пробы дополнительного стандарта, а также коэффициентом разбавления пробы (k_v) при переходе от одного градуировочного раствора к следующему:

$$k = (C_{\text{доп. ст. 1}}/C_{\text{доп. ст. i}}); \quad k = (V_{\text{доп. ст. 1}}/V_{\text{доп. ст. i}}); \\ k_v = (V_{\text{раств.}} + V_{\text{доп. ст.}})/(V_{\text{раств.}} + V_{\text{доп. ст.}} + V_{\text{аналит.}}),$$

где $C_{\text{доп. ст.}}$ — концентрация дополнительного стандарта, введённого в градуировочный раствор (1, i); $V_{\text{раств.}}$, $V_{\text{доп. ст.}}$ и $V_{\text{аналит.}}$ — объёмы растворителя, дополнительного стандарта и аналита соответственно, использованные при приготовлении градуировочных растворов.

Таким образом, если рассматриваемый концентрационный диапазон мал, то во все градуировочные растворы и анализируемые пробы добавляется одинаковое количество дополнительного стандарта и нет необходимости в использовании коэффициента k . Если же градуировочная зависимость охватывает относительно большой диапазон концентраций (больше двух порядков), то количество вводимого в растворы дополнительного стандарта различно и это должно быть учтено коэффициентом k .

Данные о градуировочных зависимостях для модельных образцов бутилацетат—изопропилбутират и ацетофенон—бутилбутират, полученные с использованием предлагаемого нами варианта абсолютной градуировки, представлены в табл. 2, а соответствующие им градуировочные графики — на рис. 3. Табл. 2 иллюстрирует то, что рассматриваемый вариант характеризуется большими коэффициентами корреляции и, как следствие, обеспечивает большую точность количественного анализа. Рис. 3 показывает видимое отсутствие разброса градуировочных точек, по сравнению с «классическим» методом абсолютной градуировки.

Важным преимуществом рассматриваемого варианта абсолютной градуировки является возможность существенного уменьшения количества параллельных определений при сохранении той же точности анализа, что и при использовании «классического» метода. Это демонстрируют данные табл. 3 для модельной смеси анизол—1-гептанол.

При этом в модифицированном варианте для каждого градуировочного образца были выбраны значения площадей пиков аналита, максимально отличающиеся друг

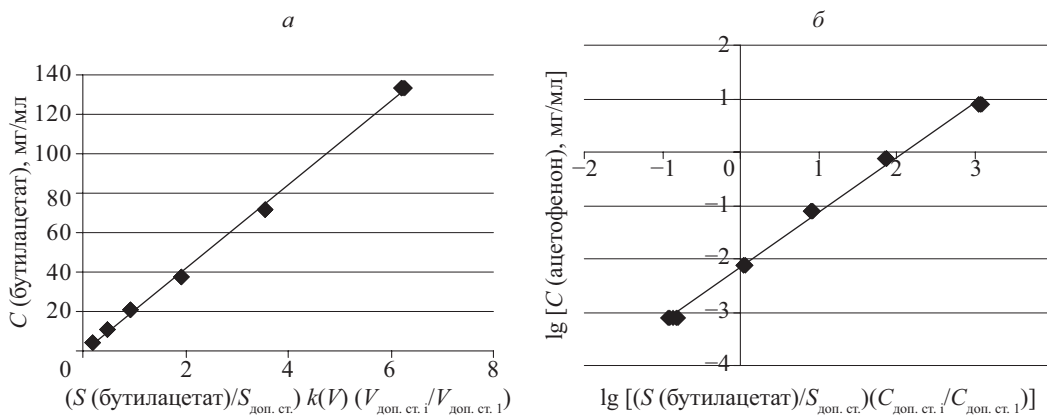


Рис. 3. Градуировочные графики зависимостей $C = f(S)$ для модельных смесей бутилацетат–изопропилбутират (а), ацетофенон–бутилбутират (б), построенные по модифицированному варианту абсолютной градуировки

от друга. Однако даже в этом случае коэффициент корреляции уравнения линейной регрессии оказался выше, чем у «классического» варианта.

Таблица 2

Параметры линейных градуировочных зависимостей, соответствующих модифицированному варианту абсолютной градуировки (2)

Аналит	Число точек	r	Параметры уравнения
Бутилацетат	30	0,998	$a' = 21,17 \pm 0,16$
			$b' = -0,5 \pm 0,5$
Ацетофенон	25	0,95	$a' = 1,028 \pm 0,015$
			$b' = -2,149 \pm 0,025$

Таблица 3

Иллюстрация возможности использования меньшего числа точек в варианте абсолютной градуировки с применением дополнительного стандарта (аналит — анизол, дополнительный стандарт — 1-гептанол)

Вариант метода абсолютной градуировки	«Классический»	Модифицированный
Число точек	20	8
r	0,998	0,9995
Параметры уравнения	$a = (2,97 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$	$a = 19,41 \pm 0,11$
	$b = 2,3 \pm 0,7$	$b = -0,42 \pm 0,26$

Заключение. Таким образом, рассматриваемый вариант абсолютной градуировки обеспечивает более высокую точность результатов анализа. При этом дополнительная стадия подготовки проб целевых образцов и градуировочных растворов (введение в них дополнительного стандарта) практически не увеличивает общие затраты времени, а на химическую природу дополнительного стандарта нет никаких ограничений.

Работа выполнена с использованием оборудования Ресурсного центра по направлению «Химия» при Институте химии Санкт-Петербургского государственного университета. Авторы выражают благодарность сотрудникам центра за содействие.

Литература

1. Asnin L. D. Peak measurement and calibration in chromatographic analysis // *Trends Anal. Chem.* 2016. doi: 10.1016/j.trac.2016.01.006.
2. Raposo F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review // *Trends Anal. Chem.* 2016. Vol. 77. P. 167–185.
3. Usher K. M., Hansen S. W., Amoo J. S., Bernstein A. P., McNally M. E. P. Precision of internal standard and external standard methods in high performance liquid chromatography // *LC-GC*. 2015. Vol. 33, N 4. P. 40–46.
4. Зенкевич И. Г., Прокофьев Д. В. Уменьшение погрешностей хроматографического анализа методами внешнего стандарта и стандартной добавки за счёт использования дополнительных стандартов // *Аналитика и контроль*. 2015. Т. 19, № 4. С. 302–309.
5. Raposo F., Borja R., Cacho J. A., Mumme J., Mohedano A. F., Battimelli A., Bolzonella D., Schuit A. D., Nogueroles-Arias J., Frigon J.-C., Penuela G. A., Muehlenberg J., Sambusiti C. Harmonization of the quantitative determination of volatile fatty acids profile in aqueous matrix samples by direct injection using gas chromatography and high-performance liquid chromatography techniques: multi-laboratory validation study // *J. Chromatogr. (A)*. 2015. Vol. 1413. P. 94–106.
6. Dolan J. W. When should an internal standard be used? // *LC-GC Europe*. 2012. Vol. 25, N 6. P. 474–480.
7. Altria K. D. Improved performance in capillary electrophoresis using internal standards // *LC-GC Europe*. 2002. Vol. 15, N 9. P. 588–594.
8. Cuadros-Rodríguez L., Bagur-Gonzalez M. G., Sanchez-Vinas M., Gonzalez-Casado A., Gomez-Saez A. M. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences // *J. Chromatogr. (A)*. 2007. Vol. 1158. P. 33–46.
9. Столяров Б. В., Савинов И. М., Вутенберг А. Г. и др. Практическая газовая и жидкостная хроматография: учеб. пособие. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002. 616 с.
10. Fortunato F. M., Bechlin M. A., Gomes Neto J. A., Donati G. L., Jones B. T. Internal standard addition calibration: determination of calcium and magnesium by atomic absorption spectrometry // *Microchem. J.* 2015. Vol. 122. P. 63–69.

References

1. Asnin L. D. Peak measurement and calibration in chromatographic analysis. *Trends Anal. Chem.*, 2016. doi: 10.1016/j.trac.2016.01.006.
2. Raposo F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. *Trends Anal. Chem.*, 2016, vol. 77, pp. 167–185.
3. Usher K. M., Hansen S. W., Amoo J. S., Bernstein A. P., McNally M. E. P. Precision of internal standard and external standard methods in high performance liquid chromatography. *LC-GC*, 2015, vol. 33, no 4, pp. 40–46.
4. Zenkevich I. G., Prokofiev D. V. Umen'shenie pogreshnostei khromatograficheskogo analiza metodami vneshnego standartarta i standartnoi dobavki za schet ispol'zovaniia dopolnitel'nykh standartov [Decreasing the chromatographic quantitation uncertainty using the external standard and standard addition methods with additional standards]. *Analitika i kontrol' [Analytics and control]*, 2015, vol. 19, no 4, pp. 302–309. (In Russian)
5. Raposo F., Borja R., Cacho J. A., Mumme J., Mohedano A. F., Battimelli A., Bolzonella D., Schuit A. D., Nogueroles-Arias J., Frigon J.-C., Penuela G. A., Muehlenberg J., Sambusiti C. Harmonization of the quantitative determination of volatile fatty acids profile in aqueous matrix samples by direct injection using gas chromatography and high-performance liquid chromatography techniques: multi-laboratory validation study. *J. Chromatogr. (A)*, 2015, vol. 1413, pp. 94–106.
6. Dolan J. W. When should an internal standard be used? *LC-GC Europe*, 2012, vol. 25, no 6, pp. 474–480.
7. Altria K. D. Improved performance in capillary electrophoresis using internal standards. *LC-GC Europe*, 2002, vol. 15, no 9, pp. 588–594.

8. Cuadros-Rodríguez L., Bagur-Gonzalez M. G., Sanchez-Vinas M., Gonzalez-Casado A., Gomez-Saez A. M. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *J. Chromatogr. (A)*, 2007, vol. 1158, pp. 33–46.

9. Stolyarov B. V., Savinov I. M., Wittenberg A. G. et al. *Prakticheskaia gazovaiia i zhidkostnaia khromatografiia* [*Practical gas and liquid chromatography: Textbook*]. St. Petersburg, SPbSU Publ., 2002. 616 p. (In Russian)

10. Fortunato F. M., Bechlin M. A., Gomes Neto J. A., Donati G. L., Jones B. T. Internal standard addition calibration: determination of calcium and magnesium by atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.*, 2015, vol. 122, pp. 63–69.

Статья поступила в редакцию 24 июня 2016 г.

Контактная информация

Прокофьев Денис Витальевич — студент; e-mail: deniss-prokofev@yandex.ru

Зенкевич Игорь Георгиевич — доктор химических наук, профессор; e-mail: izenkevich@mail15.com

Prokofiev Denis V. — student; e-mail: deniss-prokofev@yandex.ru

Zenkevich Igor G. — Doctor of Chemistry, Professor; e-mail: izenkevich@mail15.com