

# МИФЫ ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА

Ю.Каламбет

ЗАО "Амперсанд"

kalambet@ampersand.ru

**О**бсуждаются проблемы метода внутреннего стандарта, реализованного с помощью графика "отношение концентраций/отношение откликов". Приведен пример, когда при линейных зависимостях и точных измерениях метод дает ошибку определения концентрации. Описан альтернативный метод учета концентрации стандартного компонента – относительная концентрация, основанный на градуировке методом внешнего стандарта. Рассмотрен альтернативный вариант градуировки. Предложенное решение применимо, в том числе, для случая нелинейных градуировочных зависимостей. Показано, что "традиционное" решение и предложенный альтернативный подход дают эквивалентные результаты предсказания концентрации при прямо пропорциональных градуировках.

## ПРОБЛЕМЫ МЕТОДА ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА

Метод внутреннего стандарта [1-3] был изобретен для максимально точного расчета концентраций в условиях нестабильных откликов детектора, ошибок ввода пробы и потерь вещества, связанных с пробоподготовкой. Он попал во множество официальных документов, в большинстве случаев в формулировке, схожей с той, которая приведена в Европейской фармакопее [4]: "В рабочий и градуировочный растворы вводятся одинаковые количества компонента (внутреннего стандарта), который будет отделен от исследуемого вещества. Внутренний стандарт выбирается таким образом, чтобы он не реагировал с исследуемым веществом, был стабильным и не содержал примесей с таким же временем удерживания, как анализируемое вещество. Концентрация исследуемого вещества определяется сравнением отношения площадей или высот пиков, относящихся к исследуемому веществу и к внутреннему стандарту в рабочем растворе, и отношения площадей или высот пиков, относящихся к исследуемому веществу и к внутреннему стандарту в градуировочном растворе".

Другими словами, обязательной характеристикой такой градуировки является использо-

вание при ее построении отношения откликов детектора на аналит и на стандартный компонент (далее – Стандарт). Реализация этого постулата такова, что в большинстве программ градуировку предлагается строить в координатах "отношение концентраций/отношение откликов". Рассмотрим пример, иллюстрирующий данный метод. Для этого нам потребуется ввести понятие градуировки способом внешнего стандарта.

Градуировка способом внешнего стандарта описывает зависимость отклика детектора от количества вещества [4]: "Концентрация анализируемых компонентов определяется путем сравнения откликов (пиков), полученных при использовании рабочего раствора с откликами (пиков), полученных при использовании градуировочного раствора".

Введем обозначения: R – аналитический сигнал (отклик), в хроматографии – площадь или высота хроматографического пика, по выбору пользователя; Q – количество (масса) аналита, введенная в аналитический прибор. Обратим внимание, что использование концентрации аналита вместо количества для построения градуировки нежелательно – при

Пример ошибки градуировки с использованием отношения откликов

Образец	Концентрация		Потери, %	Количество		Отклик		Отношение откликов ( $R_a/R_s$ )	Отношение концентраций ( $C_a/C_s$ )	Ошибка, %
	Стандарт ( $C_s$ )	Аналит ( $C_a$ )		Стандарт ( $Q_s$ )	Аналит ( $Q_a$ )	Стандарт ( $R_s$ )	Аналит ( $R_a$ )			
Калибровочная точка 1	1	0,9	0	10	9	10	9,5	0,95	0,9	0
Калибровочная точка 2	1	1,1	0	10	11	10	10,5	1,05	1,1	0
Рабочий анализ	1	1	9	9,1	9,1	9,1	9,55	1,049	1,099	9,9
Объем пробы	10									

этом игнорируются вариации объема дозирования.

Градуировка методом внешнего стандарта – это градуировочная функция зависимости отклика  $R$  от количества введенного вещества  $Q$ :  $R = F(Q)$ .

Предсказывающая функция  $W$  оценивает неизвестное воздействие  $Q_x$  по известному отклику  $R_x$ :  $Q_x = W(R_x)$ . Она является обратной по отношению к градуировочной зависимости. Перевод количества в концентрацию вещества (абсолютную) в исходной пробе производится по формуле:

$$C_x = Q_x/V = W(R_x)/V,$$

где  $V$  – объем введенной пробы.

Традиционно градуировочная зависимость методом внутреннего стандарта строится в координатах "отношение концентраций/отношение откликов". В определяемой пробе по полученному отношению откликов вычисляется отношение концентраций [1-3]. Именно в таком виде метод фигурирует во многих нормативных документах, например в Европейской и Американской фармакопеях [4, 5].

Однако при работе с зависимостями, не являющимися прямо пропорциональными, расчет с использованием отношения откликов может давать заметные систематические ошибки. Это было замечено как нами [6], так и другими исследователями [7]. Нам удалось сконструировать совсем простой пример (см. таблицу), иллюстрирующий эти ошибки.

Пусть имеется вещество Стандарт, обладающее прямо пропорциональной градуировкой, сделанной методом внешнего стандарта, и вещество Аналит с (возможно, нелинейной) градуировкой методом внешнего стандарта, которая в пределах количества Аналита в исходной пробе 9-11 имеет линейный участок. Для построения градуировочной зависимости Аналита сделаны две пробы с концентрацией 0,9 и 1,1. Концентрация Стандарта в каждой из них равна 1. Объем вводимой пробы равен 10, мы должны умножить концентрацию на этот объем, чтобы получить количество вещества, введенное в колонку. Единицы измерения концентраций и объемов здесь не важны, результат от них не зависит.

На основании приведенных в первых двух строках таблицы данных можно построить градуировочный график как методом внешнего стандарта (рис.1), так и внутреннего стандарта (рис.2).

В качестве неизвестного анализируемого образца берем пробу с концентрацией Аналита и Стандарта 1,0; но в ходе пробоподготовки теряем 9% вещества (одинаково для Аналита и Стандарта), так что количества анализируемого вещества становятся равными 9,1 для обоих компонентов.

Метод внутреннего стандарта ставит целью минимизацию влияния подобного рода потерь, поэтому попробуем провести расчет результирующей концентрации Аналита методом внутреннего стандарта и сравним результат с известным нам ответом – ведь рабочий раствор мы готовили

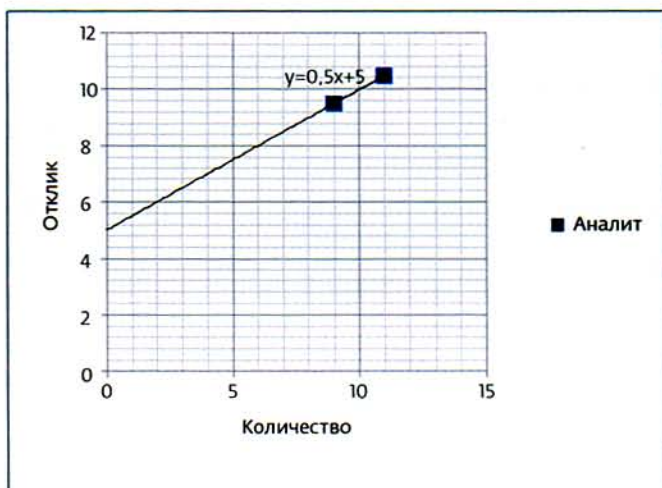


Рис.1. Градуировка Аналита методом внешнего стандарта

сами! Условия градуировки и рабочая проба выбраны таким образом, чтобы все измеряемые величины попали в диапазон градуировки, так что с точки зрения "классических метрологов" по этой части претензий быть не должно.

В строке таблицы "Рабочий анализ" приведены результаты расчета методом внутреннего стандарта. Ошибка составила 9,9%. То есть мы не только не скомпенсировали ошибку, которую бы получили при применении метода внешнего стандарта (9% потерь), но даже увеличили ее до 9,9%! Что-то неладно в этом королевстве. Пример, безусловно, искусственный и подобран так, чтобы ошибка была большой, но для корректного способа расчета такого примера не должно существовать вообще!

### ЧТО ДЕЛАТЬ?

Изменим традиционный порядок выяснения вопросов и начнем с того, что же делать? Неужели метод внутреннего стандарта вообще использовать нельзя? И как же его использовали до сих пор?

Идея, лежащая в основе метода внутреннего стандарта, вполне здравая: давайте добавим еще одно вещество, про которое мы что-то знаем, и попробуем использовать эту информацию в расчетах. Как мы видели, градуировка в координатах "отношение откликов/отношение концентраций" не решает поставленную задачу. Какие методы применить для адекватного решения задачи?

### ОТНОСИТЕЛЬНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ

Еще раз посмотрим на наш пример. По градуировке Стандарта методом внешнего стандарта мы

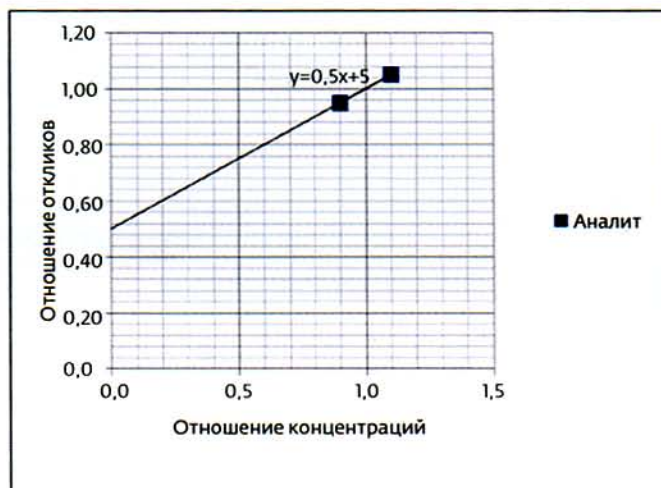


Рис.2. Градуировка Аналита методом внутреннего стандарта

видим, что детектора достигло 9,1 единиц количества Стандарта. В то же время нам известно, что концентрация Стандарта в исходном растворе равна 1 (это та самая дополнительная информация, которую мы хотим использовать). Если бы потерь не было, детектора достигло бы 10 единиц количества Стандарта. Из этих данных несложно подсчитать процент потерь и применить его к количеству Аналита – получится точная оценка концентрации Аналита в исходном растворе.

Для того чтобы не вводить новую величину (коэффициент потерь), можно применить другую логику. Давайте считать, что при работе методом внутреннего стандарта мы не знаем, какой объем исходной пробы ввели в колонку. Этот объем изменился из-за потерь вещества при пробоподготовке и ошибок дозирования. Однако по "внешней" градуировке Стандарта мы знаем, какое количество вещества достигло детектора и какова концентрация Стандарта в исходной пробе. Разделив количество Стандарта, полученное по градуировке, на концентрацию Стандарта, мы получим объем введенной пробы:  $V = W(R_s) / C_s$ . Этот объем можно применить к другим компонентам – нам достаточно разделить количество Аналита, полученное методом внешнего стандарта, на объем введенной пробы, чтобы определить его концентрацию:

$$C_a = W(R_a) / V = C_s / W(R_a) / W(R_s)$$

Концентрация вещества, рассчитываемая таким образом (концентрация в исходном растворе при том условии, что известна концентрация Стандарта в этом растворе), в программе "МультиХром" [8] названа "относительной концентрацией" [9]. Два способа описания ее расчета, приведенные выше,

отличаются только человеческой логикой, но никак не результатом расчета. **Основной количественный эффект, связанный с учетом дополнительной информации о Стандарте, связан именно с расчетом Относительной концентрации.** Любой из компонентов, концентрация которых известна, может быть использован как Стандарт для расчета относительной концентрации.

В самом деле, в нашем примере по градуировочной зависимости внешнего стандарта мы получаем количества Стандарта -  $W(R_s)=Q_s=9,1$  и Аналита -  $W(R_a)=Q_a=9,1$ . Поскольку нам известна концентрация стандарта в исходной пробе, мы можем подсчитать объем введенной пробы в пересчете на исходный анализируемый раствор:  $V = Q_s/C_s$ .

Относительная концентрация Аналита, т.е. концентрация в исходном растворе при том условии, что известна концентрация Стандарта в этом растворе, будет равна

$$C_a = Q_a/V = C_s \cdot Q_a/Q_s = 1,0;$$

что соответствует исходному раствору.

Таким образом, использование градуировки "отношение концентраций/отношение откликов" для расчета концентрации Аналита привело к неправильному расчету концентрации Аналита, в то время как относительная концентрация ошибок не дала.

## УНИВЕРСАЛЬНАЯ ГРАДУИРОВКА

Не следует заниматься градуировками, отличными от внешнего стандарта, если нет явного повода заняться этим. Единственный явный повод, известный нам - требование какого-либо нормативного (или ненормативного) документа, чтобы градуировка производилась именно методом внутреннего стандарта.

Одним из преимуществ метода внутреннего стандарта в его традиционной реализации выдвигается стабильность градуировочной зависимости. Однако о какой стабильности можно говорить, если "традиционная" градуировка не работает? И как это могли не заметить многие поколения хроматографистов?

**ЗАО «Амперсэнд» представляет**

**МультиХром**

Сегодня – это:

- детекторы
- насосы
- автосэмплеры
- термостаты
- аналого-цифровые преобразователи
- LIMS, экспорт данных и результатов
- Веб публикации
- печать отчетов
- электронные документы

- Управление хроматографическим оборудованием - более 250 приборов различных производителей.
- Обработка хроматографических данных: оригинальные методы предельного подавления шумов, адаптивной интерполяции пиков и разделения смежных пиков.
- Новый редактор ручной разметки.
- Спектральный анализ и многоканальная хроматография: обработка сигнала многоканальных детекторов; идентификация компонента по спектру пика; специальные вычислительные процедуры.
- Модуль для гель-проникающей хроматографии.
- Поддержка капиллярного электрофореза с дополнительными методами обработки данных.
- Новое в отчетах: широкие возможности форматирования - создание документов заданного образца; выдача отчетов в форматах PDF, RTF, HTML; статистические отчеты для группы хроматограмм.
- Поддержка требований "Надлежащей лабораторной практики" (GLP, 21 CFR PART 11) и электронного документооборота.

<http://www.multichrom.ru>

Безусловно, есть случай, когда "традиционный" подход работает – когда градуировка внешнего стандарта линейна и проходит через ноль (прямо пропорциональна) для всех компонентов. Соответственно, и сама градуировка "традиционным" методом внутреннего стандарта в этом случае окажется прямо пропорциональной. Поскольку в хроматографической практике чаще всего встречаются прямо пропорциональные градуировки, будем считать, что общее решение должно стыковаться с "традиционным" именно для таких градуировок.

Нами в программе "МультиХром" [8] уже более 15 лет применяется иная схема градуировки [9] в методе внутреннего стандарта, свободная от указанных недостатков. Схема основана на том, что градуировочную зависимость Стандарта нужно вводить явно, причем измерена эта зависимость должна быть методом внешнего стандарта. "Традиционный" подход, где градуировочная зависимость стандарта отсутствует, неприемлем. Зная градуировку Стандарта, можно для каждой градуировочной точки подсчитать коэффициент потерь или объем введенной пробы и использовать его для всех остальных компонентов этой пробы, т.е. применить прием, применявшийся при расчете относительной концентрации. В результате для каждого Аналита изменятся координаты градуировочных точек по оси Q:

$$Q_n = C_n \cdot V = C_n \cdot W_s(R_{si})/C_{si},$$

где индекс n относится к номеру градуировочной точки;  $C_{si}$  – концентрация Стандарта в градуировочной пробе, соответствующей этой точке. "Исправленные" точки используются для построения градуировочных зависимостей Аналитов обычным образом, как в методе внешнего стандарта.

Таким образом, для Стандарта используется тщательно построенная градуировка (возможно, заранее измеренная), все остальные компоненты получают "условные" градуировки, в качестве условия выступает известная предсказывающая функция внутреннего стандарта  $W_s(R_s)$ .

В приведенном выше модельном примере, где дает осечку "традиционный" подход, универсальная градуировка совпадает с градуировкой методом внешнего стандарта, и применение метода внутреннего стандарта сводится к расчету относительной концентрации.

## ПРОСТАЯ УНИВЕРСАЛЬНАЯ ГРАДУИРОВКА

В программе "МультиХром" предусмотрена также упрощенная схема построения универсальной гра-

дуировки, при которой внешняя градуировочная зависимость Стандарта  $R(Q)$  предполагается прямо пропорциональной. При этом внутренний стандарт получает градуировочный коэффициент 1,0, а для всех остальных компонентов вычисляются условные (или относительные) градуировочные коэффициенты, условием является равенство коэффициента Стандарта единице. При использовании упрощенной схемы можно пользоваться только относительными концентрациями, абсолютные теряют смысл.

В самом деле, умножение предсказывающей функции  $W(R_s)$  градуировки Стандарта на какой-либо коэффициент  $k$  приводит к тому, что координата  $Q$  всех градуировочных точек других компонентов умножится на то же число, и соответствующие предсказывающие зависимости получают из прежних (существовавших до умножения градуировки стандарта на  $k$ ) умножением на тот же коэффициент  $k$ . Если исследователю не требуется определять абсолютные концентрации, и есть основания полагать, что градуировка стандартного компонента прямо пропорциональна, то несложно выбрать коэффициент  $k$  так, чтобы результирующий коэффициент предсказывающей функции стандарта оказался равен 1,0, при этом коэффициенты всех остальных градуировочных зависимостей будут относительными. Более того, оказывается, что несложно выбрать схему взвешивания точек, при которой коэффициент простой универсальной градуировки будет в точности равен коэффициенту "традиционного" метода с отношением откликов.

Универсальная градуировка строится в координатах  $R_a, Q_a$ . Преобразуем  $Q_a$  с учетом простой универсальной градуировки Стандарта  $Q_s=R_s$ .

$$Q_a = C_a \cdot V = C_a \cdot Q_s / C_s = R_s \cdot C_a / C_s,$$

т.е. она отличается от "традиционной" тем, что для каждой точки обе координаты умножены на  $R_s$ .

Коэффициент взвешенной прямо пропорциональной зависимости  $Y=KX$  вычисляется по формуле

$$K = \frac{\sum_i w_i X_i Y_i}{\sum_i w_i X_i^2},$$

где  $w$  – вес точки. Для "традиционной" зависимости  $w=1$ ,  $X=C_a/C_s$ ,  $Y=R_a/R_s$

$$K = \frac{\sum_i w_i X_i Y_i}{\sum_i w_i X_i^2} = \frac{\sum_i R_{ai} \frac{C_{ai}}{R_{si} C_{si}}}{\sum_i \left(\frac{C_{ai}}{C_{si}}\right)^2}.$$

Для простой универсальной зависимости  $X=R_s \cdot C_a/C_s$ ,  $Y=R_a$ . При  $w=1$  коэффициент будет иметь величину

$$K = \frac{\sum_i X_i Y_i}{\sum_i X_i^2} = \frac{\sum_i R_{si} R_{ai} \frac{C_{ai}}{C_{si}}}{\sum_i \left( R_{si} \frac{C_{ai}}{C_{si}} \right)^2}$$

А если использовать взвешивание с  $w=(1/R_{si})^2$ , характерное для неизменной относительной ошибки измерения, коэффициент будет иметь в точности ту же величину, что и в "традиционной" градуировке:

$$K = \frac{\sum_i w_i X_i Y_i}{\sum_i w_i X_i^2} = \frac{\sum_i \frac{R_{ai}}{R_{si}} \frac{C_{ai}}{C_{si}}}{\sum_i \left( \frac{C_{ai}}{C_{si}} \right)^2}$$

Таким образом, тот фактически единственный случай, в котором работает "традиционная" градуировка, становится частным случаем универсальной градуировки.

Даже внешне такая ситуация напоминает "традиционный" подход: градуировка стандарта тривиальна, остальные компоненты получают градуировки с коэффициентами, отражающими относительный отклик детектора в сравнении со стандартом.

Количественный расчет производится через относительную концентрацию, т.е.

$$C_a = Q_a/V = R_a/K \cdot Q_s/C_s = C_s (R_a/R_s)/K,$$

что совпадает с формулой, получающейся при расчете концентрации Аналита с помощью "традиционной" градуировки.

## УЧЕТ ПРИБОРНОГО ДРЕЙФА

Представленная схема вычислений подразумевает, что основная систематическая ошибка (ввод пробы, потери при пробоподготовке) приводит к изменению положения градуировочных точек по оси количеств, и эта ошибка практически полностью подавляется расчетом относительных концентраций и универсальных градуировок. Существует также иной потенциальный источник погрешностей – нестабильность характеристик прибора. Эта составляющая может приводить к изменению отклика (площади или высоты пика) при неизменном количестве. Примененная методика может частично или полностью компенсировать и этот эффект – в той мере, в какой в диапазоне градуировки стандартного компонента зависимость  $kF(Q)$  может быть аппроксимирована зависимостью  $F(KQ)$ . Это, к примеру, всегда имеет

место при степенной зависимости  $R=KQ^\alpha$ , в частности – при прямо пропорциональной зависимости.

## СТЕПЕННАЯ ЗАВИСИМОСТЬ

На первый взгляд, в "традиционном" исполнении метода внутреннего стандарта есть частный случай, при котором он полностью адекватно работает: "внешняя" градуировка каждого компонента является степенной функцией  $R=KQ^\alpha$  с  $\alpha$ , отличным от единицы и единым для всех компонентов. В этом случае отношение откликов действительно является функцией отношения концентраций. Однако если показатель степени известен априори, то более адекватным решением представляется переопределение отклика  $R'=R^{1/\alpha}$ , при котором зависимость становится прямо пропорциональной. Если же  $\alpha$  априори не известен, т.е. его требуется измерять и доказывать его равенство для всех компонентов, то без построения зависимости внешнего стандарта не обойтись. Следовательно, методы и относительной концентрации, и универсальной градуировки будут работать адекватно.

## ПОВТОРНАЯ ГРАДУИРОВКА

Одно из достоинств метода внутреннего стандарта в его традиционной схеме – необходимость в более редкой по сравнению с методом внешнего стандарта процедуре повторного построения градуировочной зависимости. Проверим, как обстоит дело с необходимостью повторной градуировки в предложенной нами схеме.

Упрощенная процедура универсальной градуировки с единичным коэффициентом для стандарта и расчетом относительных коэффициентов для остальных компонентов в целом эквивалентна традиционной схеме. Все соображения и наблюдения относительно традиционной схемы будут применимы и здесь – относительные коэффициенты сохраняются лучше, чем абсолютные, и разница в деталях вычислительной процедуры их расчета на результат не влияет. Более того, при выборе соответствующих весов точек, относительные коэффициенты отклика, полученные в двух схемах, полностью совпадают. Пользоваться в таких условиях можно лишь относительной концентрацией.

Однако, даже если все градуировки прямо пропорциональны, можно не переключаться на простую универсальную градуировку и для контроля стабильности относительного отклика детектора использовать отношение факторов отклика Аналита и Стандарта, оставляя возможность пользоваться как относительной, так и абсолютной концентрацией.

циями. При этом не следует забывать, что значения абсолютной концентрации соответствуют методу внешнего стандарта, и при ее использовании необходима более частая повторная градуировка.

### КТО ВИНОВАТ?

Опять отступим от традиции и перейдем с личностей на метрологические причины ошибок при применении градуировки с использованием отношения откликов. Градуировка внутреннего стандарта в первую очередь предназначена для компенсации ошибок **дозирования** вещества, т.е. ошибка состоит в незнании точного положения точки на оси **количеств**. Однако делается попытка решить эту проблему путем сдвига точки по оси **откликов**. В случае прямо пропорциональных градуировочных зависимостей это не создает проблем, но, как показывает пример из таблицы, при другом виде зависимости может приводить к ошибкам.

Мы предполагали [9], что причины ошибок "традиционной" градуировки состоят в том, что градуировка Стандарта не является прямо пропорциональной. Однако приведенный пример ошибки при прямо пропорциональной градуировке Стандарта показывает, что существуют гораздо более фундаментальные проблемы. "Традиционная" градуировка принципиально непригодна для расчета в сложных случаях.

### ВЫВОДЫ

При использовании предложенных методик метод внутреннего стандарта расщепляется на две вычислительные части: расчет относительной концентрации и универсальную градуировку. Относительная концентрация учитывает информацию о концентрации и отклике стандарта в пробе и может быть рассчитана по градуировочным зависимостям как внешнего стандарта, так и универсальной градуировки. Универсальная градуировка учитывает информацию о концентрации и отклике стандарта в градуировочных образцах и строится в предположении известной градуировочной зависимости компонента - внутреннего стандарта (построенной методом внешнего стандарта) и может использоваться для одновременного вычисления как абсолютной, так и относительной концентраций. Существует упрощенная схема, в которой градуировка внутреннего стандарта принимается прямо пропорциональной с коэффициентом, равным единице. При этом остальные компоненты получают относительные градуировочные коэффициенты. Универсаль-

ная градуировка, построенная по упрощенной схеме, совместно с расчетом относительной концентрации, может использоваться при прямо пропорциональной зависимости стандарта вместо "традиционной" градуировки с использованием отношения откликов.

Представленная схема расчетов методом внутреннего стандарта продолжает работать там, где "традиционная" дает осечку, т.е. позволяет адекватно учесть значение концентрации и отклика детектора внутреннего стандарта при не прямо пропорциональных градуировочных зависимостях в широком диапазоне концентраций. В качестве внутреннего стандарта можно использовать любой из градуированных компонентов, стандартный компонент для градуировки может отличаться от стандартного компонента для расчета концентрации.

Описанный подход к реализации метода внутреннего стандарта успешно используется более 15 лет в семействе программ "МультиХром" производства ЗАО "Амперсенд".

### ЛИТЕРАТУРА

1. **N.H.Ray**. Gas chromatography. I. The separation and estimation of volatile organic compounds by gas-liquid partition chromatography. - Journal of Applied Chemistry, 1954, v.4, issue 1, p.21-25.
2. **D.E.Willis**. Internal standard method calculations. - Chromatographia, 1972, v.5, №1, p.42-43.
3. **R.W.Yost, L.S.Ettre, R.D.Conlon**. Practical Liquid Chromatography. An Introduction. - Perkin-Elmer, 1980.
4. **The European Pharmacopoeia 6th ed., Council of Europe European (COE)**. - European Directorate for the Quality of Medicines, 2007, www.edqm.eu
5. **The United States Pharmacopoeia** - National Formulary, www.usp.org
6. **Каламбет Ю.А.** Метод внутреннего стандарта - идея и воплощение. - Партнеры и конкуренты, 2004, №4, с.32-36.
7. **A.Hewavitharana**. Internal standard - friend or foe? - Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2009, v.39 Issue 4, p.272-275.
8. **Программно-аппаратный комплекс "МультиХром"**. - ЗАО "Амперсенд", 1991-2012, www.multichrom.ru
9. **Каламбет Ю.А., Козьмин Ю.П.** Калибровка методом внутреннего стандарта при нелинейных калибровочных зависимостях. В кн.: Руководство по современной тонкослойной хроматографии./Под ред. Ларионова О.Г. - М.: Научный совет РАН по хроматографии, 1994, с.180-184.