

РУКОВОДСТВО ПО СОВРЕМЕННОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

По материалам школы-семинара по тонкослойной
хроматографии - июль 1993 года г. Москва

Книга представляет собой практическое руководство по современной количественной тонкослойной хроматографии. В основу книги положены лекции, прочитанные зарубежными и отечественными специалистами на летней международной школе по современной ТСХ. Материал книги включает вопросы пробоподготовки при анализе проб воды и почв. Рассмотрены основные неподвижные и подвижные фазы в ТСХ и их влияние на разделение; экспериментальные методы современной ТСХ, включая нанесение пробы, сканирование, детектирование, методику автоматизированного многократного проявления, методы корректной калибровки при обработке данных.

В приложении приведены примеры практических занятий, позволяющие овладеть описанными методами, а также информация об основных зарубежных и отечественных фирмах, производящих оборудование и материалы для ТСХ.

Книга рассчитана на научных и инженерных работников, специализирующихся практически во всех областях науки и техники, связанных с анализом объектов окружающей среды, сертификацией продуктов питания, лекарственных препаратов, клиническим и токсикологическим анализом.

Перевод: С.А.Бусев, А.В.Митрошков, В.В.Петренко

Под редакцией профессора О.Г.Ларионова

Ил. 112 Табл. 32 Библиогр.: 146

Рецензенты: проф. Б.Г.Беленький
проф. И.А.Ревельский

4.5. КАЛИБРОВКА МЕТОДОМ ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА ПРИ НЕЛИНЕЙНЫХ КАЛИБРОВОЧНЫХ ЗАВИСИМОСТЯХ

Ю.А.Каламбет, Ю.П.Козьмин*

**Институт молекулярной генетики РАН, Москва 123060, а/я 439
Институт биоорганической химии РАН им.Шелякина, Москва*

4.5.1. Резюме

Описан алгоритм расчетов при калибровке методом внутреннего стандарта, позволяющий получать адекватные результаты при нелинейных калибровочных зависимостях. Алгоритм реализован в программе "МультиХром" (AMPERSAND Ltd, Россия).

Алгоритм основан на предположении, что калибровочная зависимость компонента - внутреннего стандарта заранее известна или получена в калибровочной серии экспериментов методом внешнего стандарта. Расчеты с использованием этого алгоритма могут быть особенно эффективны при вариантах детектирования с характерными нелинейными зависимостями, например в тонкослойной хроматографии.

4.5.2. Введение

Одним из важнейших этапов в количественном хроматографическом анализе является построение калибровочных зависимостей. Эти зависимости используются при вычислении концентраций компонентов в исходной пробе в зависимости от площади или высоты пика соответствующего компонента.

Для увеличения точности вычислений Реем [1] был предложен метод внутреннего стандарта, призванный компенсировать ошибки, связанные с дозированием и потерями вещества при пробоподготовке.

Суть метода заключается в добавлении к анализируемой пробе вещества - внутреннего стандарта и учете площади соответствующего пика на хроматограмме при расчете концентраций остальных компонентов смеси. Известная концентрация вещества в совокупности с данными о полученном отклике де-

тектора действительно улучшают воспроизводимость получаемых результатов до долей процента.

Причина улучшения воспроизводимости состоит в учете дополнительной информации о концентрации внутреннего стандарта. Эта информация может быть учтена как на этапе расчета концентрации, так и на этапе получения калибровочной зависимости.

В литературе часто метод внутреннего стандарта неявно интерпретируется только как метод вычисления концентраций компонентов [2] и вопрос калибровки при использовании этого метода не обсуждается. Следует отметить, что такая интерпретация имеет под собой основания, поскольку расчет по методу внутреннего стандарта возможен и дает неплохие результаты при калибровке методом внешнего стандарта или при использовании литературных данных об относительных коэффициентах отклика детектора.

Обычно расчет концентрации i -го компонента C_i в методе внутреннего стандарта производится по формуле

$$C_i = C_{(st)} \frac{K_i R_i}{K_{(st)} R_{(st)}} = C_{(st)} K'_{(st)} \frac{R_i}{R_{(st)}} \quad (1)$$

где K – абсолютный коэффициент отклика детектора, K' – нормированный коэффициент отклика детектора (коэффициент отклика детектора на стандартный компонент при нормировании принимается за единицу), R – отклик детектора (площадь или высота соответствующего пика), нижний индекс (st) относится к соответствующим величинам для стандартного компонента.

В тех случаях, когда предлагается построение калибровочного графика для метода внутреннего стандарта [3], он строится в координатах $(Q_i/Q_{(st)}, R_i/R_{(st)})$ или $(Q_i, Q_{(st)}R_i/R_{(st)})$, где Q – количество компонента, равное произведению его концентрации на инжектированный объем.

Указанная схема расчета применяется достаточно широко, однако не обеспечивает адекватных результатов при нелинейных калибровочных зависимостях. В самом деле, понятия коэффициента отклика детектора или относительного коэффициента при нелинейных зависимостях перестают быть корректными.

Кривая, характеризующая нелинейность детектора, может быть построена только в том случае, когда по одной из осей откладывается абсолютное значение отклика детектора, т.е. в координатах (Q, R) . Использование анаморфозы, изменяющей значение отклика детектора R путем домножения на величину $Q_{(st)}/R_{(st)}$ недопустимо, поскольку эта величина при нелинейной калибровочной зависимости стандартного компонента не постоянна.

4.5.3. Теория

В предложенном нами алгоритме коэффициенты регрессии $W(R)$ вычисляются методом наименьших квадратов в координатах (Q, R) , где Q – количество вещества в пике, R – площадь или высота пика. Количество i -го компонента вычисляется с учетом известной концентрации стандарта в k -м калибровочном растворе, отклика детектора на внутренний стандарт $R_{(st)k}$ и калибровочной зависимости компонента – внутреннего стандарта $W_{(st)}(R)$ и равно

$$Q_{ik} = C_{ik} \cdot W_{(st)}(R_{(st)k}) / C_{(st)k} \quad (2)$$

где C_{ik} – концентрация калибруемого компонента в k -м калибровочном растворе. Формула (2) корректирует положение калибровочных точек по оси количества компонента Q , оставляя значение отклика детектора R таким, каким он получился в эксперименте.

В случае, если калибровочная зависимость компонента – внутреннего стандарта линейная и ее коэффициент принимается за единицу, расчет эквивалентен традиционной схеме расчета относительных калибровочных коэффициентов методом внутреннего стандарта.

При вычислении неизвестной концентрации компонента C_i используется формула

$$C_i = C_{(st)} \frac{W_i(R_i)}{W_{(st)}(R_{(st)})} \quad (3)$$

где $C_{(st)}$ – концентрация компонента – внутреннего стан-

дарта в анализируемой смеси. При линейных калибровочных зависимостях формула (3), как и следовало ожидать, превращается в формулу (1).

4.5.4. Процесс калибровки

Процесс калибровки состоит из двух этапов. На первом этапе получается калибровочная зависимость компонента-внутреннего стандарта, на втором – всех остальных компонентов. Калибровка стандартного компонента проводится методом внешнего стандарта. На двух этапах калибровки используются разные наборы калибровочных данных (в некоторых случаях эти наборы могут совпадать). На первом этапе предъявляются повышенные требования к точности дозирования пробы, характерные для калибровки методом внешнего стандарта. На втором этапе можно уделять меньшее внимание точности дозирования, поскольку калибровочная кривая стандартного компонента заранее известна и используется для уточнения введенной дозы.

4.5.5. Обсуждение

Следует особо остановиться на разнице между расчетом и калибровкой по методу внутреннего стандарта. Наибольший эффект на воспроизводимость результатов оказывает учет дополнительной информации на этапе расчета (формула 3), даже если калибровка проведена методом внешнего стандарта.

Калибровка методом внутреннего стандарта служит для получения более точных значений коэффициентов калибровочной зависимости, вычисленных с учетом известной в каждом калибровочном опыте площади и концентрации стандартного компонента.

Результирующая калибровочная зависимость строится в тех же координатах, что и зависимость, получаемая методом внешнего стандарта, и при отсутствии ошибок измерения и дозирования зависимости, полученные обоими методами, должны бы совпасть.

Для получения концентрации компонента в анализируемой пробе по предложенному алгоритму требуется использование

сразу двух калибровочных зависимостей: исследуемого компонента и стандарта. При расчетах без использования ЭВМ это может вызывать некоторое неудобство в работе. Применение ЭВМ для построения калибровочных зависимостей позволяет спрятать от пользователя все сложности расчетов и обеспечивает необходимое удобство работы.

Следует отметить, что при одноточечной калибровке применение калибровочного метода внутреннего стандарта не дает никаких преимуществ по точности расчета перед методом внешнего стандарта, поскольку все зависимости являются линейными и разница между методами состоит только в использовании относительного или абсолютного коэффициентов отклика детектора.

4.5.6. Выводы

Предложенная схема расчета будет приносить наиболее ощутимый эффект при одновременном выполнении двух условий:

1. Нелинейная калибровочная зависимость стандартного компонента.
2. Вариация площади пика стандартного компонента от опыта к опыту.

Наиболее перспективно применение предложенной схемы в тонкослойной хроматографии, поскольку здесь, как правило, калибровочные зависимости оказываются нелинейными.

ЛИТЕРАТУРА

1. N.H.Ray. J. Appl. Chem., 1954, v.4, p.21.
2. К.И.Сакодынский, В.В.Бражников, С.А.Волков, В.Ю.Зельвенский, Э.С.Ганкина, В.Д.Шатц. Аналитическая хроматография. Москва, "Химия", 1993.
3. М.Крейчи, Я.Паюрек, Р.Коммерс и др. Вычисления и величины в сорбционной колоночной хроматографии. Москва, "МИР", 1993.