

В статье описан подход к реализации метода внутреннего стандарта при построении градуировочной зависимости в хроматографическом анализе

МЕТОД ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА – ИДЕЯ И ВОПЛОЩЕНИЕ

Для построения градуировочной зависимости метод внутреннего стандарта [1, 2] давно и широко применяется в аналитической практике. Основные проблемы, которые он позволяет решать — уменьшение систематических погрешностей, возникающих после использования метода внешнего стандарта при вариациях объема анализируемой пробы, потерях вещества при пробоподготовке и вследствие нестабильности характеристик детектора. Суть его заключается в добавлении в анализируемую смесь чистого вещества (стандартного компонента), отсутствующего в пробе, известной концентрации и последующий учет исходной информации (концентрация стандартного компонента) и результатов измерения (отклик детектора, соответствующий стандартному компоненту) при расчете концентраций остальных компонентов пробы.

«Традиционный» вариант реализации метода внутреннего стандарта

«Традиционная» градуировочная зависимость внутреннего стандарта строится в координатах «отношение концентраций/отношение площадей». Под термином «внутренний стандарт» зачастую, к сожалению, понимается построение именно такого вида зависимости. В то же время градуировочная зависимость, построенная в таких координатах, не позволяет полноценно учитывать дополнительную информацию при нелинейных градуировочных зависимостях. Приведем два примера, иллюстрирующих указанную проблему.

Рассмотрим два гипотетических компонента: компонент *A* (аналит) и компонент *S* (стандарт). Градуировочные зависимости обоих компонентов, полученные методом внешнего стандарта (рис. 1), выхо-

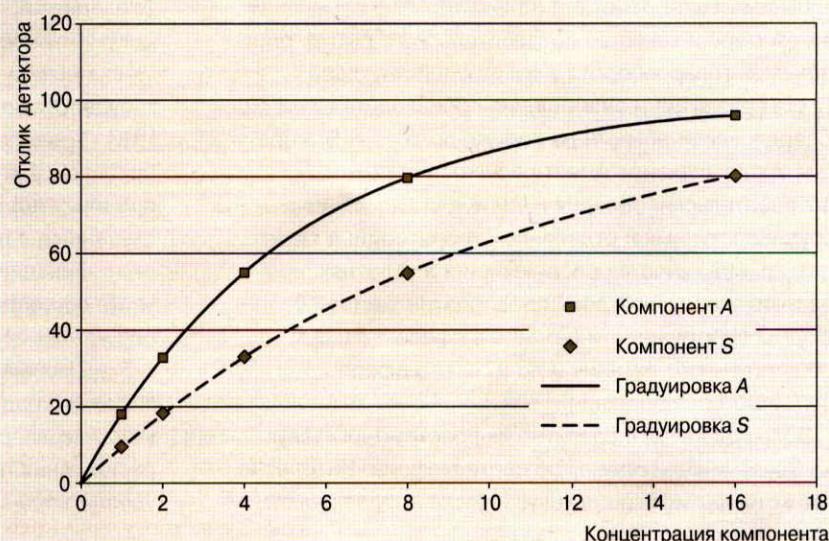


Рис. 1. Градуировочные зависимости двух гипотетических компонентов, имеющие формулу $R = (100 - \exp(-Q/(k*C)))$, где $k = 5$ (компонент *A*) и $k = 10$ (компонент *S*). Ось концентраций при строго фиксированном объеме вводимой пробы используется вместо оси количеств. Точки для каждого компонента получены при значениях $C = 1, 2, 4, 8, 16$.

АВТОР

Ю.А. Каламбет —
генеральный директор
ЗАО «Амперсенд»

дят на насыщение на одном и том же уровне, начальный наклон отличается вдвое.

Пример 1. Пусть имеется раствор, содержащий два компонента в равной концентрации. Градиуровочные растворы получены разведением этого раствора в 2, 4, 8, 16 раз.

Построим график в координатах «отношение концентраций/отношение откликов детектора» (см. рис. 2).

Опытные хроматографисты на-веряют, что пример не жизненный и так никто не делает. Возражение не принимается, поскольку не делает так никто, в частности, потому, что вычислительная схема (построение зависимости в указанных координатах) к такому «экстремально-му» случаю не приспособлена. В самом деле, приведенный на рис. 2 график градиуровочной зависимостью называется недосто-

ин, и пытаться им воспользоваться для решения аналитической задачи, демонстрирующей его ошибочность, мы не будем.

Пример 2. Второй пример наглядно демонстрирует, что проблемы остаются и при соблюдении предположения о постоянстве концентрации внутреннего стандарта в градиуровочных и тестовых анализах, к чему обычно стремятся при реализации этого метода.

Пусть при построении градиуровочной зависимости компонента *A* удалось точно поддержать концентрацию компонента *S* равной 8,0. Тогда вид градиуровочной зависимости компонента *A* можно получить из градиуровочной зависимости, изображенной на рис. 1, перенесением осей.

Предположим, что при тестовом анализе концентрация компонента *A* равна 1,0 (ее предстоит определить), концентрация компонента *S* равна 8,0, как и при градиуровке, но при вводе пробы произошла ошибка, уменьшившая объем пробы на 3%. При этом отклик стандартного компонента *S* по градиуровочной зависимости, приведенной на рис. 1, уменьшился на 1,98%, а отклик компонента *A* — на 2,72%. Отношение откликов будет равно 0,3267 (вместо величины 0,3292, имеющей место для соответствующей градиуровочной точки на рис. 3). Найденная по градиуровочной зависимости, изображенной на рис. 3, концентрация компонента *A* окажется равной 0,9917, что отличается от искомой единицы почти на 1%. Таким образом, оказывается, что цель использования метода внутреннего стандарта достигнута не в полном объеме: ошибка дозирования была компенсирована не полностью, хотя и уменьшилась.

Реализация метода внутреннего стандарта в программе «МультиХром»

В программе «МультиХром» [3] уже более 10 лет применяется

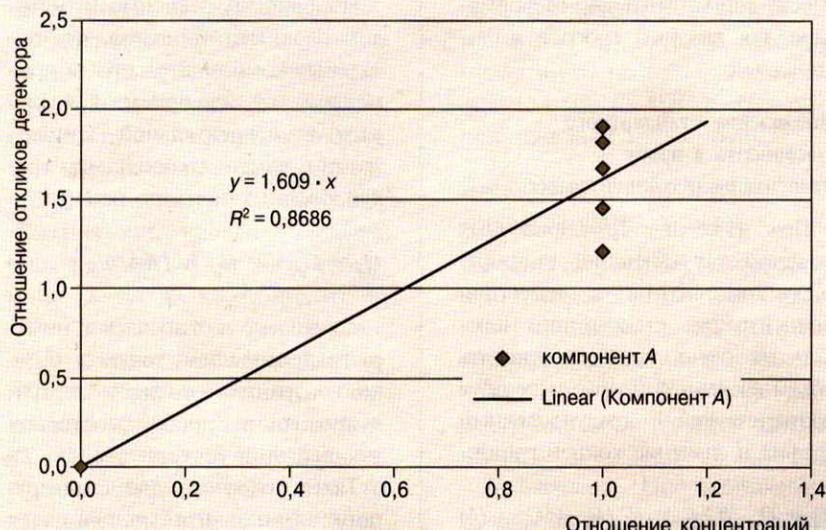


Рис. 2. «Традиционный» график градиуровочной зависимости, построенный в координатах «отношение концентраций/отношение площадей». Поскольку концентрации компонента *A* и стандартного компонента для всех 5 градиуровочных точек равны, их отношение дает всегда 1,0, а отношение площадей принимает разные значения.

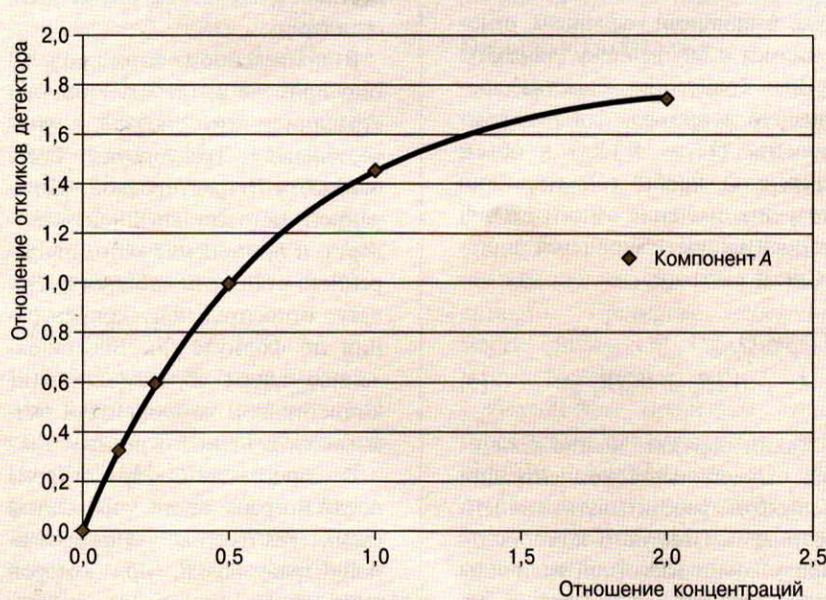


Рис. 3. Градиуровочная кривая, полученная для компонента *A* методом внутреннего стандарта. Концентрация (количество) стандарта соответствует точке кривой *S* (рис. 1) с абсциссой, равной 8,0.

иная схема расчета [4] в методе внутреннего стандарта, лишенная указанных недостатков.

Схема основана на том, что если градуировочная зависимость внутреннего стандарта нелинейна, то эту нелинейность следует измерить, поэтому ситуация «традиционного» подхода, где градуировочная зависимость стандарта отсутствует, неприемлема.

Введем следующие понятия и обозначения:

R — аналитический сигнал (отклик детектора) (в хроматографии — площадь или высота хроматографического пика, по выбору пользователя);

Q — масса аналита, введенная в аналитический прибор.

Обратим внимание, что использование концентрации (C) аналита вместо количества (Q) нежелательно, поскольку при этом игнорируются вариации объема дозирования.

Градуировочная функция зависимости отклика R от количества введенного вещества Q имеет вид:

$$R = F(Q). \quad (1)$$

Предсказывающая функция оценивает неизвестное воздействие Q_x по известному отклику R_x :

$$Q_x = W(R_x). \quad (2)$$

Предсказывающая функция (2) является обратной по отношению к градуировочной зависимости (1). Существование обратной функции налагает определенные ограничения на саму градуировочную функцию: появляется требование монотонности.

К примеру, градуировка не может быть квадратичной с максимумом внутри рабочего диапазона.

Перевод количества вещества (Q) в концентрацию (C) в исходной пробе производится на основе формулы:

$$C_x = Q_x/V = W(R_x)/V, \quad (3)$$

где V — объем введенной пробы.

Перейдем к используемым способам учета дополнительной информации о концентрации и отклике стандартного компонента.

Способы реализации метода внутреннего стандарта:

- добавление компонента известной концентрации в пробу;
- добавление компонента известной концентрации в растворы стандартных образцов.

В «традиционном» варианте используют оба способа, но можно учесть дополнительную информацию для каждого способа индивидуально.

Добавление стандартного компонента в пробу — относительная концентрация

При известных градуировочных зависимостях (внешний стандарт) всех компонентов и известной концентрации стандартного компонента очень просто вычислить объем введенной пробы, используя соответствующий градуировочный график и значение концентрации:

$$V_x = Q_{x, is}/C_{x, is} = W_{is}(R_{x, is})/C_{x, is}, \quad (4)$$

где V — объем пробы; нижний индекс x относится ко всем величинам, полученным при анализе пробы неизвестного состава; индекс is приписан величинам, относящимся к внутреннему стандарту.

Зная количество вещества, достигшего детектора, для i -го компонента $Q_{x, i} = W_i(R_{x, i})$ и объем введенной пробы (4), несложно получить значение относительной концентрации компонента в исходном растворе:

$$\begin{aligned} C_{x, i} &= Q_{x, i}/V_x = \\ &= C_{x, is} \times W_i(R_{x, i})/W_{is}(R_{x, is}). \end{aligned} \quad (5)$$

Таким образом, знание величины относительной концентрации позволяет рассчитывать концентрацию неизвестного компонента при условии известной величины концентрации стандарта. Эта концентрация может существовать наряду с концентрацией,

рассчитанной обычным образом (абсолютная концентрация) по формуле (3).

«Универсальная» градуировка с добавлением стандартного компонента

Если градуировочная зависимость нелинейна, необходимо измерить эту нелинейность, измерив градуировочную зависимость компонента — внутреннего стандарта.

Измерив эту зависимость методом внешнего стандарта, для остальных компонентов пробы применяем тот же прием, как при расчете относительной концентрации, изменения координаты градуировочных точек по оси Q :

$$Q_n = C_n \times V = C_n \times W_{is}(R_{is})/C_{is}, \quad (6)$$

где индекс n относится к номеру градуировочной точки, а C_{is} — концентрация стандарта в градуировочной пробе, соответствующей этой точке.

Таким образом, для стандартного компонента используется заранее измеренная градуировка, все остальные компоненты получают «условные» градуировки, в качестве условия выступает известная градуировка внутреннего стандарта.

В приведенном выше модельном примере 2, где «дает осечку» «традиционный» подход, «универсальная» градуировка будет совпадать с градуировкой, полученной методом внешнего стандарта, и применение метода внутреннего стандарта сводится к расчету относительной концентрации по формуле (5). Восстановленное таким образом значение концентрации компонента A оказывается в точности равным 1,0.

В программе «МультиХром» предусмотрена также упрощенная схема построения «универсальной» градуировки, при которой зависимость стандартного компонента предполагается линейной и проходящей через ноль. При этом

внутренний стандарт получает градуировочный коэффициент 1,0, а все остальные компоненты — относительные градуировочные коэффициенты. При использовании упрощенной схемы можно использовать только относительные концентрации, поскольку использование абсолютных концентраций не имеет смысла.

В самом деле, умножение предсказывающей функции 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 получаются из прежних (существовавших до умножения градуировки стандартного компонента на K) умножением на тот же коэффициент K . Если перед исследователем не стоит задача определения абсолютных концентраций и есть основания полагать, что градуировка стандартного компонента линейна и проходит через ноль, 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. Даже внешне такая ситуация напоминает «традиционный» подход: градуировка стандарта тривиальна, остальные компоненты получают градуировки с коэффициентами, отражающими относительный отклик детектора в сравнении со стандартом.

Учет приборного дрейфа

Представленная схема вычислений подразумевает, что основная систематическая погрешность (ввод пробы, потери при пробоподготовке) приводит к изменению положения градуировочных точек по оси количества, и эта ошибка практически полностью устраняется при использовании метода внутреннего стандарта.

Существует также иной потенциальный источник погрешностей: нестабильность характеристик прибора. Эта составляющая может приводить к изменению отклика детектора (площади или высоты) 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 $R=KQ^a$, в частности при линейной зависимости.

Преимущества и недостатки описанной схемы расчетов

Преимущества. Метод внутреннего стандарта доступен и адекватен при работе с нелинейными градуировочными зависимостями и при широком диапазоне концентраций стандартного компонента.

Недостатки. При нелинейных зависимостях требуется градуировка стандартного компонента методом внешнего стандарта. Недостатком схемы расчета это не является. Это недостаток методики анализа.

Повторная градуировка

Одно из достоинств метода внутреннего стандарта состоит в его «традиционной» схеме — необходимость в более редкой по сравнению с методом внешнего стандарта процедуре повторного построения градуировочной зависимости. Проверим необходимость повторной градуировки в представленной схеме.

Упрощенная процедура «универсальной» градуировки с единственным коэффициентом для стандартного компонента и расчетом относительных коэффициентов для остальных компонентов в целом эквивалентна «традиционной» схеме, и все соображения и наблюдения относительно

«традиционной» схемы будут применимы и здесь — относительные коэффициенты более постоянны, чем абсолютные, и разница в деталях вычислительной процедуры их расчета на результат не влияет (более того, выбором схемы взвешивания точек при расчете градуировочных коэффициентов разница процедур может быть полностью ликвидирована). Использовать в таких условиях можно лишь относительную концентрацию.

При нелинейной градуировке стандартного компонента измерение этой градуировочной характеристики производится в определенных условиях (температура, состояние детектора и т.д.), а измерение характеристик остальных компонентов может происходить в других условиях. За счет использования в формулах построения «универсальных» зависимостей остальных компонентов градуировки стандарта происходит как бы приведение условий измерения остальных компонентов к условиям измерения градуировки стандарта. При этом использование относительных концентраций позволит получить адекватный результат, а использование абсолютных концентраций будет зависеть от качества градуировки внутреннего стандарта. Особенно привлекательным вариантом работы с «универсальной» градуировкой может стать применение схем с более частой повторной градуировкой стандарта и заметно более редкой остальных компонентов.

Если все градуировочные характеристики измеряются одновременно, то большой разницы между значениями относительной концентрации, рассчитанными по градуировке внешнего стандарта или «универсальной», не возникает. При использовании только относительной концентрации частота переградуировок должна определяться в каждом конкретном случае. По нашему мнению, она ближе

к частоте, характерной для метода внутреннего стандарта. Значения абсолютной концентрации соответствуют методу внешнего стандарта, и при ее использовании возникает необходимость в более частой повторной градуировке.

Выводы

1. Метод внутреннего стандарта «расщепляется» на две вычислительные части: расчет относительной концентрации и «универсальную» градуировку.

2. Относительная концентрация учитывает информацию о концентрации и отклике стандартного компонента в пробе и может быть рассчитана по градуировочным зависимостям как внешнего стандарта, так и «универсальной».

3. «Универсальная» градуировка учитывает информацию о концентрации и отклике стандартного компонента в градуировочных образцах и строится в предполо-

жении известной градуировочной зависимости компонента — внутреннего стандарта (построенной методом внешнего стандарта).

4. Существует упрощенная схема, в которой градуировка внутреннего стандарта принимается линейной, проходящей через начало координат, с коэффициентом, равным единице. При этом остальные компоненты получают относительные градуировочные коэффициенты. «Универсальная» градуировка, построенная по упрощенной схеме, совместно с расчетом относительной концентрации, может использоваться при линейной проходящей через начало координат зависимости стандарта вместо «традиционной» градуировки методом внутреннего стандарта.

5. «Универсальная» градуировка, построенная по полной схеме, может использоваться для вычисления как абсолютной, так и относительной концентраций.

6. 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 нелинейных градуировочных зависимостях в широком диапазоне концентраций.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

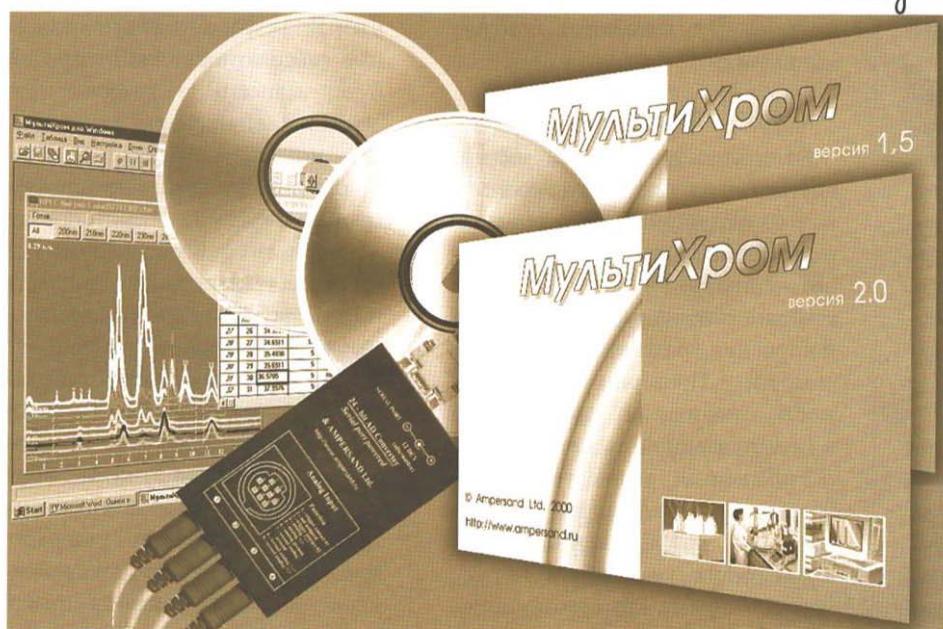
- Ray N.H. // J. Appl. Chem. — 1954. — V. 4. — P. 21.
- Yost R.W., Ettre L.S., Conlon R.D. Practical Liquid Chromatography. An Introduction. — Perkin-Elmer, 1980.
- Программно-аппаратный комплекс «МультиХром для Windows». — © ЗАО «Амперсенд», 1993—2004.
- Каламбет Ю.А., Козьмин Ю.П. Калибровка методом внутреннего стандарта при нелинейных калибровочных зависимостях // Руководство по современной тонкослойной хроматографии / Под ред. О.Г. Ларионова. — М.: Научный Совет Российской Академии Наук по хроматографии, 1994. — С. 180—184.

МультиХром

для Windows

Надежная система автоматизации хроматографии

Самая популярная в России!



ЗАО «АМПЕРСЕНД»

адрес: 123060 г. Москва, а/я 80
тел./ факс: (095) 196-18-57, 196-52-90
эл. почта: support@ampersand.ru
интернет: http://www.ampersand.ru

