

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

МОРОЗОВА ТАТЬЯНА ЕВГЕНЬЕВНА

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ ГЕТЕРОГЕННЫХ
СРЕД В УСЛОВИЯХ НЕЛИНЕЙНОГО ОТКЛИКА СИСТЕМ**

Специальность 02.00.02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург-2014

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность:

Важнейшим преимуществом метода стандартной добавки по сравнению с другими методами количественного хроматографического анализа считают его применимость для анализа образцов, матрицы которых обладают сорбционными свойствами. Кроме того, большинство методов количественного хроматографического анализа предназначено для анализа гомогенных образцов. Что же касается метода стандартной добавки, то он применим для определения суммарных содержаний целевых аналитов в гетерофазных системах по результатам анализа только одной из фаз до и после добавки.

Повышение точности количественного определения аналитов в сложных матрицах методом стандартной добавки предполагает подробную характеристику факторов, которые могут влиять на результаты количественного анализа. Основными из них являются сорбционные свойства матриц, нелинейность детектирования (например, при использовании электроспрея в качестве метода ионизации) и недостаточная инертность хроматографических систем, проявляющаяся в заметно выраженных эффектах сорбции наиболее полярных аналитов.

Использование метода однократной стандартной добавки в таких случаях может приводить к значительным погрешностям результатов количественных определений. Такие погрешности можно скомпенсировать, используя вариант метода, предусматривающий несколько последовательных добавок определяемых аналитов в образец с последующей математической обработкой результатов (чаще всего применяют их экстраполяцию на «нулевую» величину добавки). Таким образом, применение метода последовательных стандартных добавок становится целесообразным в случаях отчетливо выраженной зависимости определяемых количеств аналитов от масс добавок. Такие зависимости характерны не только для образцов, матрицы которых обладают сорбционными свойствами, но и в условиях нелинейности детектирования целевых аналитов, а также при недостаточной инертности хроматографических систем.

Настоящая работа посвящена рассмотрению возможностей применения метода последовательных стандартных добавок с учетом зависимости эффективного аналитического отклика системы от количества введенной добавки. Предложен общий подход к использованию различных аппроксимирующих функций для оценки искомых содержаний аналитов.

Цель работы: Охарактеризовать возможности распространения метода последовательных стандартных добавок для анализа образцов, матрицы которых обладают сорбционными свойствами, в условиях нелинейности детектирования аналитов, а также при недостаточной инертности

хроматографических систем с целью повышения точности количественных определений.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. С использованием образцов, матрицы которых обладают сорбционными свойствами, установить характер зависимостей определяемых количеств аналитов от масс добавок, выбор аппроксимирующих функций и способа обработки результатов;
2. Распространить метод последовательных стандартных добавок на условия нелинейности детектирования и недостаточной инертности хроматографических систем.
3. Сравнить метод последовательных стандартных добавок с другими методами количественного хроматографического анализа по критерию точности результатов;

Научная новизна:

1. Предложен новый алгоритм интерпретации результатов количественного хроматографического анализа методом последовательных стандартных добавок, заключающийся в аппроксимации зависимости определяемых количеств аналитов от масс добавок. Установлено, что такие зависимости могут быть как убывающими, так и возрастающими;
2. Выявлены примеры аналитических задач, требующие экстраполяции результатов количественных определений на бесконечно большие добавки; предложены соответствующие экстраполирующие функции;
3. Показано, что предложенный алгоритм интерпретации результатов, получаемых методом последовательных стандартных добавок применим в условиях как нелинейности детектирования, так и при недостаточной инертности хроматографических систем;
4. Предложен критерий оценки и способ контроля инертности хроматографических систем.

Практическая значимость работы:

Показано, что:

- метод последовательных стандартных добавок в предлагаемом варианте учета зависимости определяемых количеств аналитов от масс добавок целесообразно применять при анализе образцов, матрицы которых обладают сорбционными свойствами (фармацевтические препараты, природные и биологические объекты), в том числе для определения суммарного содержания аналитов в гетерофазных системах по результатам анализа только одного из слоев, в условиях нелинейности детектирования, а также при недостаточной инертности хроматографических систем;

- предложенный критерий контроля инертности хроматографических систем позволяет оценить минимальное количество полярных аналитов для которых влиянием сорбционных эффектов на точность результатов количественных определений еще можно пренебречь

Положения выносимые на защиту:

1. Новый алгоритм интерпретации результатов количественного хроматографического анализа методом последовательных стандартных добавок путем аппроксимации зависимости определяемых количеств аналитов от масс добавок;
2. Особенности интерпретации убывающих и возрастающих зависимостей определяемых количеств аналитов от масс добавок; критерий выбора «направления» экстраполяции и вид экстраполирующих функций;
3. Результаты применения метода последовательных стандартных добавок для количественного определения аналитов, в матрицах, обладающих сорбционными свойствами, в условиях нелинейности детектирования, а также при недостаточной инертности хроматографических систем;
4. Критерий оценки и способ контроля инертности хроматографических систем.
5. Методики анализа различных образцов в том числе фармацевтических препаратов (гидрофобные аналиты в гидрофобных матрицах и гидрофильные веществ в водных растворах).

Публикации и апробация работы: Материалы диссертационной работы опубликованы в 7 статьях и 8 тезисах докладов. Результаты исследований представлены на Всероссийской конференции «Хроматография – народному хозяйству» (г. Дзержинск. 19-23 апреля 2010); «Химия в современном мире» Санкт-Петербург. (18-22 апреля 2011); «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва. 5-9 сентября 2011 г.); конкурсе бизнес-идей, научно-технических проектов «Молодые, дерзкие, перспективные» Санкт-Петербург. (27 сентября 2011 г.); на Всероссийской конференции «Менделеев-2012», г. Санкт-Петербург, «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» г. Краснодар (май 2013 г.) и II Всероссийском симпозиуме с участием иностранных ученых «Кинетика и динамика обменных процессов» Краснодарский край, с. Дивноморское 2-9 ноября 2013 г., 30th International Symposium on Microscale Bioseparations, Pecs, Hungary, April 27-May 1, 2014; Городской семинар по органической химии (февраль 2013 г.).

Структура и объем диссертационной работы: Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения полученных результатов (7 разделов), выводов, заключения, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на 109 страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка и 24 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дано обоснование актуальности темы и сформулирована цель диссертационной работы.

2-я глава (Обзор литературных данных) включает разделы, посвященные рассмотрению особенностей различных методов количественного хроматографического анализа: абсолютной градуировки, внутренней нормализации, внутреннего стандарта, известных вариантов метода стандартной добавки, а также источников погрешностей при его использовании.

В **3-й главе (Экспериментальная часть)** рассмотрены процедуры приготовления анализируемых образцов; условия хроматографических анализов; примеры хроматограмм и масс-спектров, а также условия обработки полученных данных с использованием программных обеспечений MultiChrom, LCMS Solution, GC Solution, Microsoft Excel, Origin (8.0).

Четвертая глава (Обсуждение результатов) включает несколько разделов:

Метод стандартной добавки можно использовать в различных вариантах, простейшим из которых является вариант однократной стандартной добавки:

$$M_x = \frac{M_{cm} S_x}{S_{x+cm} - S_x} \quad (1)$$

где M_x – количество определяемого соединения, M_{cm} – количество добавки S_x и S_{x+cm} – площади пиков определяемого соединения до и после введения добавки, соответственно.

В варианте нескольких последовательных добавок ($i \geq 2$) чаще всего проводят экстраполяцию полученных результатов на нулевую величину добавки с использованием уравнения (3).

$$M_{xi} = \frac{\sum m_{доб/i}}{\frac{P_i}{P_1} - 1} \quad (2)$$

$$S = am_{доб} + b, \quad (3)$$

где M_{xi} – масса определяемого компонента, $\sum m_{доб/i}$ – суммарное количество стандартной добавки на i -й стадии, P_1 и P_i – площади пиков определяемого компонента до и после i -й добавки, соответственно.

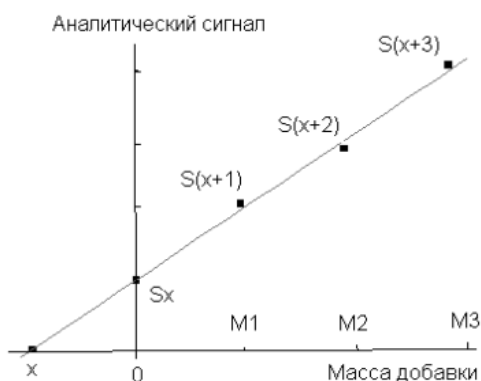


Рис. 1. Графическая иллюстрация определения содержания целевых аналитов «традиционным» вариантом метода последовательных стандартных добавок [в виде зависимости $S(m_{доб})$] с экстраполяцией результатов на «нулевую» величину добавки

В разделе 4.1 рассматриваются результаты анализа гидрофобных и гидрофильных модельных образцов с содержанием определяемых компонентов 0.5–1.0 % мас. Сложности анализа подобных образцов обусловлены необходимостью учета влияния выбранных матриц, содержащих 40 - 60 % мас. сорбентов с развитой удельной поверхностью в сочетании с вязкими нехроматографируемыми веществами (смазочное масло, ПЭГ-1200). Для подобных образцов рациональнее всего использовать именно метод стандартной добавки с предварительным превращением исходных проб в гетерофазные системы и анализом фаз, содержащих меньшие количества мешающих компонентов.

По-видимому, основной недостаток существующего варианта метода последовательных стандартных добавок состоит в сложностях выявления нелинейных зависимостей $M_x(m_{доб})$ по графику зависимости (3) (рис.1). Такие эффекты выявлять проще, если представлять данные не в «традиционной» форме «аналитический сигнал – масса добавки» (формула 3), а в координатах «определяемое количество – масса добавки»:

$$M_x = am_{доб} + b \quad (4)$$

Все значения M_x при этом вычисляют по формуле (1). Из-за проявления эффектов сорбции все найденные значения M_x меньше заданных, причем, в зависимости от знака коэффициента a , возможны два вида таких зависимостей (убывающие, т.е. $dM_x/dm_{доб} < 0$, и возрастающие: $dM_x/dm_{доб} > 0$).

Убывающие зависимости $M_x = am_{доб} + b$, общий вид которых иллюстрирует рис. 2а, были выявлены как для модельных, так и для реальных образцов. Такой их вид можно объяснить тем, что относительные доли сорбированных матрицами аналитов возрастают с увеличением их количеств в результате добавок. Кроме того, это может быть связано, например, с изменением свойств подготовленных проб в результате добавок определяемых веществ, в частности, изменением их коэффициентов распределения в гетерофазных системах.

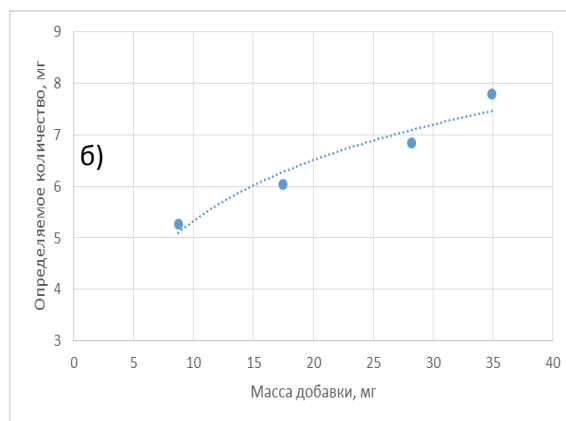
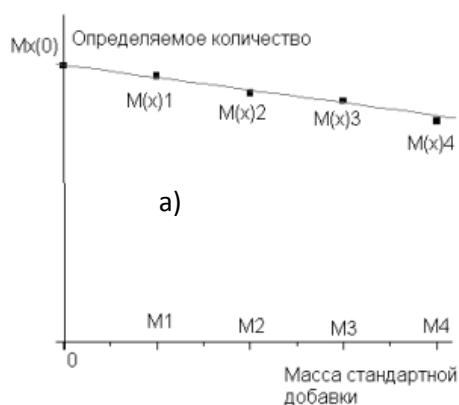


Рис. 2. а) Убывающая зависимость определяемых количеств аналитов от массы стандартной добавки; интерпретация результатов предполагает их экстраполяцию на нулевую величину добавки; б) Возрастающая зависимость определяемого количества *втор*-бутилтолуола в гидрофобной матрице от массы стандартной добавки (пример II, табл. 1); интерпретация результатов предполагает их экстраполяцию на бесконечно большую величину добавки.

Второй вариант зависимостей $M_x = am_{\text{доб}} + b$ оказывается более сложным для интерпретации. Если представить данные табл. 1 (на примере разных добавок к серии параллельных проб) в координатах «определяемое количество – масса добавки», то оказывается, что в этом случае рассматриваемые зависимости относятся к типу возрастающих, что иллюстрирует рис. 2б.

Таблица 1. Результаты оценки содержания аналитов с использованием последовательных добавок *втор*-бутилтолуола (гидрофобная матрица) и 1-гептанола (гидрофильная матрица) к одной пробе (I) и параллельных добавок к серии проб (II) с использованием гиперболического соотношения $M_x = a/m_{\text{доб}} + b$, при $m_{\text{доб}} \rightarrow \infty$.

Вариант анализа	Добавка <i>втор</i> -бутилтолуола, мг (гидрофобная матрица)				Экстраполированное значение, мг	Задано, мг	Относительная погрешность определения, %
	8.73	17.46	26.19	34.92			
Найдено (I), мг	5.64	6.05	5.98	6.25	6.3	8.8	-28
Найдено (II), мг	5.26	6.04	6.84	7.80	8.0		-10
	Добавка 1-гептанола, мг (гидрофильная матрица)						
	8.22	16.44	24.66	32.88			
Найдено (I), мг	4.52	5.43	5.54	5.46	6.0	6.5	-7.7

Найдено (II), мг	4.53	5.08	6.14	5.47	6.2		-4.6
---------------------	------	------	------	------	-----	--	------

Физико-химический смысл таких зависимостей может быть связан с тем, что относительные доли сорбированных матрицами аналитов уменьшаются с увеличением их количеств в результате добавок. Причиной этого может быть исчерпывающее насыщение активной поверхности сорбентов аналитами и/или компонентами матриц. Естественно, что в таком случае коррекция результатов также требует экстраполяции, но уже не на «нулевые» стандартные добавки (в сторону уменьшения M_x), а на бесконечно большие добавки (то есть, как и в предыдущем случае, в сторону увеличения M_x). При этом вид функций, рекомендуемых для такой экстраполяции, остается теоретически неопределенным; главным требованием к ним является стремление к предельным значениям при $m_{доб} \rightarrow \infty$. Следует учитывать, что относительно небольшое число экспериментальных точек для выбора зависимостей $M_x = f(m_{доб})$ ограничивает число параметров в соответствующих уравнениях (не более 2-3). Не располагая достаточными основаниями для предпочтения одних функций другим, мы выбрали для аппроксимации возрастающих зависимостей $M_x = f(m_{доб})$ простейший (двухпараметровый) вариант гиперболической функции $M_x = a/m_{доб} + b$, для которой $\lim(M_x) | m_{доб} \rightarrow \infty = b$. Результаты оценки содержания определяемых компонентов в гидрофобных и гидрофильных матрицах приведены в табл. 1.

Относительные погрешности такого способа составили (-5)–(-8) % в случае определения 1-гептанола в полярных матрицах и несколько больше для *втор*-бутилтолуола в неполярных. При этом следует иметь в виду, что иных столь же простых и приемлемых по точности способов количественного анализа подобных образцов в настоящее время не существует. Принципиальных различий между вариантами последовательных добавок в одну и ту же пробу или разных добавок в серию параллельных проб не выявлено. Однако можно отметить (табл. 1), что вариант параллельного дозирования добавок к серии образцов (II) характеризуется несколько большей точностью, что согласуется с литературными рекомендациями.

В разделе 4.2 рассмотрены результаты определения камфоры в фармацевтических препаратах методом последовательных стандартных добавок. Источником ошибок методов как однократной стандартной добавки, так и последовательных стандартных добавок является непостоянство объема проб, дозируемых в хроматограф. Для компенсации этих ошибок в ходе подготовки проб в образцы обычно рекомендуют вводить внутренний стандарт. При этом все абсолютные значения площадей пиков заменяют относительными. В этом случае формула (2) должна быть модифицирована следующим образом:

$$M_{xi} = \frac{\sum m_{доб/i}}{\frac{P_i / P_{peni}}{P_1 / P_{pen1}} - 1} \quad (5)$$

где M_{xi} – масса определяемого компонента, $\sum m_{доб/i}$ – суммарное количество стандартной добавки на i -й стадии, P_1 и P_i – абсолютные площади пиков определяемого компонента до и после i -й добавки, соответственно, P_{pen1} и P_{peni} – абсолютные площади внутреннего стандарта до и после введения добавки, соответственно.

Анализ содержащих камфору фармацевтических препаратов проводили с использованием n -тридекана в качестве внутреннего стандарта.

Погрешности результатов количественных определений активных компонентов мази BENGAY для двух вариантов определений I (с использованием абсолютных площадей пиков) и II (с использованием относительных площадей пиков) составляют -0.2 % и -0.6 %, соответственно, что иллюстрирует высокую точность используемого варианта метода стандартной добавки. Смоделировать образец мази не представлялось возможным, поскольку состав гидрофобной матрицы не указан.

Менее точное совпадение результатов с указанным составом образцов было получено при анализе камфорной мази. Причиной этого может являться летучесть камфоры. При сравнении погрешностей определения содержания камфоры двумя вариантами метода последовательных стандартных добавок (-5.6 % для варианта I и -3.2 % для варианта II) можно сделать вывод о том, что точность второго варианта выше.

Анализ Оригинального Большого Бальзама Биттнера, в отличие от остальных препаратов, проводили с использованием двух экстрагентов. Результаты определения содержания камфоры при использовании хлороформа следует считать более надежными, чем в случае хлористого метилена. Применение более низкокипящего растворителя приводит к его испарению, и, как следствие, занижению результатов анализа (увеличению систематической погрешности определений). Найденное содержание камфоры в Оригинальном Большом Бальзаме Биттнера значительно отличается от указанного (на ~ 30 %), что, вероятно, связано с летучестью этого соединения или/и с нарушениями технологического процесса изготовления препарата.

В разделах 4.3 и 4.4 рассмотрены результаты применения метода последовательных стандартных добавок в условиях нелинейности детектирования на примере анализа моноэтаноламина (МЭА) в водных растворах и 3-(2,2,2-триметилгидразиний)пропионовой кислоты в моче при использовании электроспрея в качестве метода ионизации. Этот метод характеризуется невысокой воспроизводимостью результатов определений (особенно «day-to-day») и ограниченной линейностью детектирования. В таблице 2 приведены результаты количественного определения МЭА в водных растворах методом

последовательных стандартных добавок в условиях нелинейности детектирования в разных концентрационных диапазонах.

Таблица 2. Результаты количественного определения моноэтаноламина в водных растворах методом последовательных стандартных добавок в условиях нелинейности детектирования (более подробный вариант таблицы приведен в тексте диссертации)

Параметр определений	МЭА (серия 1)	Пиридин (серия 1)	МЭА (серия 2)
Заданное количество (мкг/мл)	0,125	0,125	2.0
$m_{доб1}$, МКГ	0,375	0,125	1.0
$m_{доб2}$, МКГ*	0,875	0,375	2.0
$m_{доб3}$, МКГ	-	0,875	-
C_{x1} , МКГ/мл**	0,23	0,15	1,88
C_{x2} , МКГ/мл**	0,35	0,18	1,84
C_{x3} , МКГ/мл**	-	0,27	-
a	0,24	$0,17 \pm 0,02$	-0,03
b	0,14	$0,13 \pm 0,01$	1,91
Найдено (мкг/мл) $C_{x,0} \pm$ станд. откл.	$0.14 \pm 0,12$	$0.13 \pm 0,01$	$1.92 \pm 0,13$
r	-	0,998	-

Примечания: *) для второй добавки указано суммарное с первой количество аналитов, для третьей – суммарное с двумя предыдущими;

**) значения приведены без погрешностей, поскольку данные результаты можно рассматривать как промежуточные

Расчет значений $M_{x,0}$ проводили по уравнению линейной регрессии, которое при экстраполяции результатов на нулевую величину добавки эквивалентно $M_{x,i} = b$. В таблице 2 приведены значения $M_{x,0}$, вычисленные по двум (МЭА) и трем (пиридин) добавкам. Больше число добавок использовать нерационально.

Сравнение методов абсолютной градуировки и метода последовательных стандартных добавок проводили в условиях нелинейности детектирования. Результаты такого сравнения приведены в таблице 3.

Таблица 3. Пример результатов определения концентраций 3-(2,2,2-триметилгидразиний)-пропионовой кислоты в модельных образцах, полученных методом абсолютной градуировки и методом последовательных стандартных добавок (ПСД) с экстраполяцией результатов на бесконечно большие величины добавок

Задано, мкг/мл (C_0)	Найдено методом нелинейной абсолютной градуировки, мкг/мл, (C_x)	Относительная погрешность, $(C_x - C_0)/C_0$, %	Найдено методом ПСД, мкг/мл, (C_y)	Относительная погрешность, $(C_y - C_0)/C_0$, %
50	30 ± 16	40	49 ± 6	4
400	293 ± 51	27	427 ± 22	9
600	545 ± 76	9	563 ± 16	7

Как следует из данных таблицы 3, по сравнению с методом абсолютной градуировки метод последовательных стандартных добавок (ПСД) дает результаты более близкие к заданным. Относительные погрешности в первом случае составляют всего 4-9 %, тогда как во втором 9-40 %. Только лишь для наибольшей концентрации 600 мкг/мл результаты определений двумя методами сравнимы по точности. Однако следует еще раз отметить, что большая точность метода ПСД по сравнению с нелинейной абсолютной градуировкой достигается за счет несколько больших затрат времени, что может стать существенным ограничением при необходимости анализа больших серий образцов.

Выражение для двукратной стандартной добавки может быть записано в явном виде (формула 6) и было использовано при количественном определении моноэтаноламина:

$$M_{x,0} = \frac{m_{\text{доб1}} \cdot m_{\text{доб2}}}{m_{\text{доб2}} - m_{\text{доб1}}} \cdot \left(\frac{S_x}{S_{x+\text{доб1}} - S_x} - \frac{S_x}{S_{x+\text{доб2}} - S_x} \right) \quad (6)$$

Для оценки погрешности $M_{x,0}$ необходимо численное дифференцирование уравнения (6), для чего использовали программное обеспечение Maple.

В разделе 4.5 рассмотрен алгоритм выбора способа экстраполяции результатов, полученных методом последовательных стандартных добавок.

Существует два принципиально разных способа дополнительной обработки получаемых результатов, а именно 1) экстраполяция на «нулевые» величины добавок и 2) экстраполяция на бесконечно большие величины добавок. Вторым вариант впервые выявлен в данной работе, и число иллюстрирующих его примеров пока еще невелико. Тем более затруднительно предсказать характер экстраполяции результатов на основании природы образцов.

Тем не менее, математический критерий выбора варианта аппроксимации может быть предложен. При этом вид зависимостей $M_x(m_{\text{доб}})$ или $C_x(m_{\text{доб}})$ (возрастающие или убывающие) не может являться критерием такого выбора. Более информативным критерием оказывается сопоставление отношений $\Delta S_{\text{доб}i} / C_{\text{доб}i} = (S_{x+\text{доб}i} - S_x) / C_{\text{доб}i}$. Уменьшение из величин при переходе от первой к последующим добавкам отвечает экстраполирующей функции $C_x = am_{\text{доб}} + b$ и, следовательно, «направлению» экстраполяции $m_{\text{доб}} \rightarrow 0$, тогда как их увеличение соответствует функции $C_x = a/m_{\text{доб}} + b$ и $m_{\text{доб}} \rightarrow \infty$, соответственно. Значения таких отношений могут быть оценены непосредственно по исходным данным до их обработки. Для этого минимальное число отношений $\Delta S_{\text{доб}i} / C_{\text{доб}i}$ может быть равно двум, но для

последующего вычисления параметров регрессионных уравнений $C_x = f(m_{\text{доб}})$ с использованием метода наименьших квадратов число добавок должно быть не менее трех.

Указанное общее правило можно проиллюстрировать на примере анализа раствора 3-(2,2,2-триметилгидразиний)-пропионовой кислоты (ТНР) с концентрацией 50 мкг/л. Значения четырех отношений $(S_{x+\text{доб}} - S_x)/C_{\text{доб}}$ равны 17.1, 17.3, 18.2 и 20.9, то есть образуют возрастающую последовательность. Для образца с концентрацией ТНР 400 мкг/л) три отношения равны 14.8, 17.8 и 20.0. Следовательно, в обоих случаях требуется экстраполяция результатов на бесконечно большие величины добавок.

В разделе 4.6 рассмотрены возможности применения логистической регрессии для экстраполяции результатов количественного анализа, полученных методом последовательных стандартных добавок.

Логистическая регрессия может быть описана следующим известным нелинейным четырехпараметровым соотношением:

$$y = \frac{a}{1 + b \exp(-kx)} + c \quad (7)$$

Соответствие вычисленных с помощью уравнения логистической регрессии и экспериментальных данных в пределах 15 % наблюдается в девяти из 13 примеров, что несколько меньше, чем точность аппроксимации двумя другими методами.

В разделе 4.7 рассмотрены критерий оценки и способ контроля инертности хроматографических систем, необходимые для обсуждения возможностей применения метода последовательных стандартных добавок в диапазонах концентраций аналитов, соответствующих областям недостаточной инертности.

Под инертностью хроматографических систем можно понимать отсутствие сильно выраженных эффектов сорбции наиболее полярных аналитов, которые могут сказываться на результатах их количественных определений.

Известные ранее принципы контроля инертности хроматографических систем предполагали использование смесей тест-компонентов. Предлагаемый нами принцип контроля инертности систем жестко не связан с какими-либо веществами и допускает их широкий выбор в зависимости от характера аналитических задач. К основным принципам выбора тест-веществ следует отнести минимальное число компонентов в таких образцах (два) и их химическую природу. Один из них должен обладать минимальной полярностью (алкан). В качестве второго целесообразно выбрать полярное соединение, имеющее активные атомы водорода.

Такие смеси предложено анализировать в виде нескольких растворов с разными абсолютными концентрациями компонентов (использована серия

разбавлений 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, при необходимости этот ряд может быть продолжен), поскольку сорбционные эффекты хроматографических систем должны проявляться при минимальных содержаниях компонентов, и обычно мало заметны для концентрированных растворов. При переходе к более разбавленным растворам в первую очередь подвержены дискриминации относительные площади пиков полярных компонентов, имеющих активные атомы водорода. Причиной этого является их сорбция элементами хроматографических систем.

Для каждого раствора вычисляют средние значения относительных площадей пиков компонента (x) $\langle S_i \rangle$, и их стандартные отклонения, s_i , то есть $\langle S_1 \rangle \pm s_1$, $\langle S_2 \rangle \pm s_2, \dots$. Далее сравниваем разности относительных площадей пиков первого и последующих образцов, $D_i = \langle S_1 \rangle - \langle S_i \rangle$, и соответствующие им суммы стандартных отклонений $\sum s_i = s_1 + s_i$. Абсолютные количества аналитов целесообразно представлять в форме индексов массы,

$$pM = -\lg(M) \quad (8)$$

где значение M выражено в граммах.

Величины $\sum s_i$ при уменьшении концентраций растворов, как правило, несколько увеличиваются, так что зависимость $\sum s_i = f(pM_i)$ может быть аппроксимирована уравнением линейной регрессии:

$$\sum s_i = c pM_i + d \quad (9)$$

Возрастающая зависимость $D_i(pM)$ ($D_i = S_{отн1} - S_{отни}$) выражена в гораздо большей степени, что характеризует увеличение влияния недостаточной инертности хроматографической системы на результаты количественных определений при уменьшении количеств аналитов:

$$D_i = c' pM_i + d' \quad (10)$$

На графике (рис. 3) точка пересечения прямых, соответствующих уравнениям (9) и (10), отвечает предельному количеству аналита, при котором влияние недостаточной инертности хроматографической системы на результаты количественного анализа статистически еще не значимо. Алгебраическое решение системы уравнений (9) и (10), относительно $pM_{пред}$ имеет вид:

$$pM_{пред} = (d' - d)/(c - c') \quad (11)$$

Следовательно, область инертности можно определить неравенством $pM_{пред} < (c - c')/(d - d')$, а область ее отсутствия $pM_{пред} > (c - c')/(d - d')$.

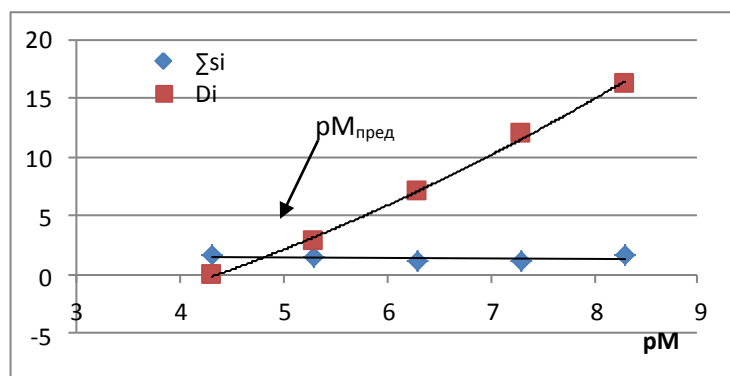


Рис. 3. Графическая иллюстрация характеристики инертности хроматографической системы

Количество вещества в пробе вычисляют по формуле (12) (при условии, что каждый последующий раствор готовили из предыдущего разбавлением в 10 раз):

$$pM_x = -lg \frac{\rho \times V_{\text{пробы}}}{k \times 10^n \times (T + 1)} \quad (12)$$

где M_x – масса вещества в пробе, г, ρ – плотность полярного компонента, г/мл, $V_{\text{пробы}}$ – объем пробы, дозируемой в хроматограф, мл, k – количество компонентов в исходной смеси, n – число разбавлений в 10 раз, T – деление потока при дозировании проб в капиллярную колонку со сбросом.

Границей инертности газохроматографической системы по отношению к характеризованному веществу следует считать такое его количество в пробе (выраженное в форме индекса массы, $pM = -lg(M)$ раствора смеси с инертным компонентом (n -алканом), при котором различия в относительных площадях его пиков по сравнению с более концентрированными растворами начинают превышать суммы стандартных отклонений самих относительных площадей.

Таблица 4. Оценка инертности хроматографических систем (более подробный вариант таблицы приведен в тексте диссертации)

<i>Насадочная колонка с неполярной фазой</i>			
Компонент	Температура термостата колонок (°С)	$pM_{\text{пред}}$	$M_{\text{пред}}$ (мкг)
1-Гептанол	90	6,2	0,6
	80	5,5	3,3
	80↑2	6,7	0,2
<i>Капиллярная колонка с неполярной фазой</i>			
1-Гептанол	90	7,4	0,04
	80	7,1	0,08
	80↑2	7,3	0,04
	80↑2	6,9	0,1

Как следует из данных таблицы 4, граница инертности зависит от типа колонки и ее температуры. Чем выше температура термостата колонок, тем больше значение $rM_{пред}$, и, соответственно, меньше граница инертности системы. При переходе от насадочной к капиллярной колонке обычно наблюдается заметное увеличение значения $rM_{пред}$. Данные закономерности выполняются для всех используемых полярных компонентов тест-систем.

Недостаточная инертность хроматографической системы определяет выбор метода количественного анализа. Только несколько методов применимы в таких условиях, в том числе метод последовательных стандартных добавок.

Таблица 5. Результаты применения метода последовательных стандартных добавок в условиях отсутствия инертности хроматографической системы для системы октан- 1-гептанол

<i>Насадочная колонка с неполярной фазой</i>			
Компонент	Задано (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	Вариант экстраполяции
Октан	17,5	18,3 ± 0,6	→ 0
1-Гептанол	25,0	23,7 ± 0,5	→ ∞
<i>Капиллярная колонка с неполярной фазой</i>			
Компонент	Задано (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	Вариант экстраполяции
Октан	17,5	16,7 ± 0,9	→ ∞
1-Гептанол	25,0	19,5 ± 0,5	→ 0

Применение метода ПСД дает удовлетворительные результаты количественного определения выбранных компонентов. Следует отметить, что вариант однократной стандартной добавки в данном случае неприемлем.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что результаты количественного хроматографического анализа методом последовательных стандартных добавок целесообразно представлять не в виде зависимости площадей пиков определяемых соединений от массы добавки, а в виде зависимости определяемых количеств аналитов от масс добавок. Такая форма представления результатов позволяет выявить, что зависимость определяемых количеств аналитов от масс добавок может быть как убывающей, так и возрастающей.
2. Обработка результатов включает экстраполяцию полученных данных либо на нулевую либо на бесконечно большую величины добавок. Предложен критерий выбора направления экстраполяции и вид экстраполирующих функций.
3. Показано, что метод последовательных стандартных добавок применим не только при анализе образцов со сложными матрицами, обладающими сорбционными свойствами, но и в областях нелинейности детектирования

(включая ВЭЖХ-МС), а также в случаях недостаточной инертности хроматографических систем.

4. Предложен критерий оценки и способ контроля инертности хроматографических систем основанный на результатах анализа не единичного образца раствора смеси тест-веществ, а серии таких растворов с последовательно убывающими концентрациями компонентов.

5. На основе новых вариантов метода последовательных стандартных добавок разработаны методики количественного анализа различных образцов не требующие сложных способов подготовки проб или построения нелинейных градуировочных зависимостей в том числе фармацевтических препаратов (гидрофобные аналиты в гидрофобных матрицах) и гидрофильных веществ в водных растворах [моноэтаноламин, 3-(2,2,2-триметилгидразиний)-пропионовая кислота].

Основные материалы диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Зенкевич И.Г., Морозова Т.Е. Особенности метода стандартной добавки для количественного определения аналитов в сложных матрицах, обладающих сорбционными свойствами // Аналитика и контроль. 2010. Т. 14. № 3. С. 164-171.
2. Морозова Т.Е., Зенкевич И.Г. Новые варианты метода стандартной добавки. Газохроматографическое определение камфоры в фармацевтических препаратах // Вест. С.-Петербур. Ун-та. 2011. Сер. 4. Вып. 4. С. 61-68.
3. Зенкевич И.Г., Морозова Т.Е. Особенности ВЭЖХ-МС определения моноэтанолamina в водных растворах методом стандартной добавки // Аналитика и контроль. 2012. Т. 16. № 2. С. 181-187.
4. Морозова Т.Е., Мариничев А.Н., Зенкевич И.Г. Количественный анализ методом стандартной добавки в условиях нелинейности детектирования. ВЭЖХ-МС определение моноэтанолamina в водных растворах // Вест. С.-Петербур. Ун-та. 2012. Сер. 4. Вып. 4. С. 126-132.
5. Морозова Т.Е., Каракашев Г.В., Сорокоумов П.Н., Савельева Е.И., Зенкевич И.Г. Сравнение точности метода абсолютной градуировки и модифицированного метода последовательных стандартных добавок на примере определения 3-(2,2,2-триметилгидразиний)пропионовой кислоты в моче в условиях нелинейности детектирования (электроспрей) // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17. № 2. С. 184-189.
6. Мариничев А.Н., Морозова Т.Е., Зенкевич И.Г. Применение логистической регрессии при количественном анализе методом последовательных стандартных добавок // Успехи современного естествознания. 2013. № 11. С. 152-157.

7. Зенкевич И.Г., Морозова Т.Е. Области применения и особенности количественного хроматографического анализа методом последовательных стандартных добавок // Журнал аналитической химии. 2014. Т. 69. № 4. С. 369-377.
8. Морозова Т.Е., Зенкевич И.Г. Модификация метода стандартной добавки для газохроматографического определения аналитов в сложных матрицах «Хроматография – народному хозяйству» г. Дзержинск. 19-23 апреля 2010. Тезисы докладов.
9. Морозова Т.Е. Новые варианты количественного газохроматографического анализа методом стандартной добавки. Определение камфоры в фармацевтических препаратах «Химия в современном мире» Санкт-Петербург. 18-22 апреля 2011. Тезисы докладов.
10. Морозова Т.Е., Зенкевич И.Г. Особенности ВЭЖХ-МС определения моноэтаноламина в водных растворах методом стандартной добавки «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» Москва. 5-9 сентября 2011 г. Тезисы докладов.
11. Морозова Т.Е. Новый способ количественного хроматографического анализа для контроля качества фармацевтических субстанций «Молодые, дерзкие, перспективные» Санкт-Петербург. 27 сентября 2011 г. Тезисы докладов.
12. Морозова Т.Е. Контроль инертности хроматографических систем для повышения точности количественного анализа методом стандартной добавки // VI Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «МЕНДЕЛЕЕВ-2012», г. Санкт-Петербург.
13. Морозова Т.Е., Зенкевич И.Г. Количественное определение моноэтаноламина в водных растворах методом ВЭЖХ-МС в условиях нелинейности детектирования «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» г. Краснодар, 26-31 мая 2013 г.
14. Зенкевич И.Г., Морозова Т.Е., Критерий инертности хроматографических систем «Кинетика и динамика обменных процессов» Краснодарский край, с. Дивноморское 2-9 ноября 2013 г.
15. Zenkevich Igor G., Morozova Tatiana E. «New approach in evaluating the inertness of gas chromatographic systems» // 30th International Symposium on Microscale Bioseparations, Pecs, Hungary, April 27-May 1, 2014.
16. Zenkevich I.G., Morozova T.E. New approach in evaluating the inertness of gas chromatographic systems, abstr. 38th International Symp. On Capillary Chromatography (38 ICCS), Riva del Garda, Italy, May 18-23. 2014. A01.