

Сравнительная характеристика различных вариантов количественного хроматографического анализа способами внешнего и внутреннего стандартов

***И.Г. Зенкевич, О.В. Агафонов, Т.С. Александров, К.А. Барбаянов, Н.Р. Валов, В. Власова, Е.А. Знаменская, М.Д. Ким, У.О. Маркова, В.П. Моргачева, Е.Р. Низов, А.Д. Огурцова, К.В. Павлова, А.В. Пантин, И.В. Симдянов, А.Э. Таишев, Д.Е. Чечуева, Д.П. Шатковский, Р.А. Шилов**

ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Институт химии, Российская Федерация, 198504, Санкт-Петербург, Университетский просп., 26

*Адрес для переписки: Зенкевич Игорь Георгиевич, E-mail: izenkevich@yandex.ru

Поступила в редакцию 05 июля 2023 г., после доработки - 19 августа 2023 г.

Хроматографический анализ серии характеризуемых и градуировочных двухкомпонентных образцов (растворы аналита и стандарта) позволяет сопоставить возможности и особенности одновременно шести вариантов количественных определений способами внешнего и внутреннего стандарта по критериям точности результатов (значениям случайных и систематических погрешностей). Они включают простейший вариант способа внешнего стандарта (I), модифицированный вариант, предполагающий использование дополнительного стандарта и усреднение не абсолютных, а относительных площадей пиков (II), обычно используемый способ внутреннего стандарта (III) и его модифицированную аналогичным образом версию (IV). Кроме этого рассмотрены два варианта использования гомолога аналита в качестве внутреннего стандарта без учета градуировочных коэффициентов (V) и (VI). Это представляет интерес для оптимизации практических работ по хроматографии и процесса обучения предмету.

Требования к дополнительным и внутренним стандартам не идентичны. В качестве дополнительных стандартов можно выбирать любые соединения, как введенные в образцы искусственно, так и уже присутствующие в них, причем точное задание их концентраций не требуется. Необходимо лишь обеспечить их равенство в характеризуемом и градуировочном растворах. Показано, что модифицированные варианты методов внешнего и внутреннего стандартов характеризуются одинаковыми относительными стандартными отклонениями результатов.

Показано, что минимальными случайными составляющими погрешностями характеризуются варианты, предполагающие применение дополнительного (II) или внутреннего стандарта (IV) и усреднение отношений площадей пиков целевых аналитов и таких стандартов. Для них же минимальны систематические погрешности определений. Для выявления возможных искажений состава анализируемых образцов, обусловленных частичным испарением летучих компонентов в процессе работы с такими образцами, информативен контроль значений градуировочных коэффициентов.

Ключевые слова: Газовая хроматография, количественный анализ, способы внешнего и внутреннего стандарта, сравнение различных вариантов.

Comparative characterization of different variants of quantitative chromatographic analysis using external and internal standards

Igor G. Zenkevich*, **Oleg V. Agafonov**, **Timofei S. Aleksandrov**, **Kirill A. Barbayanov**, **Nikita R. Valov**, **Vassilissa Vlassova**, **Ekaterina A. Znamenskaya**, **Mia D. Kim**, **Ulyana O. Markova**, **Violetta P. Morgacheva**, **Egor R. Nizov**, **Anna D. Ogurtsova**, **Ksenija V. Pavlova**, **Andrew V. Pantin**, **Ivan V. Simdianov**, **Arthur E. Taishev**, **Daria E. Chechueva**, **Denis P. Shatkovskii**, **Roman A. Shilov**

*St. Petersburg State University, Institute of Chemistry, 26 Universitetskii Ave.,
St. Petersburg, 198504, Russian Federation*

*Corresponding author: Igor G. Zenkevich, E-mail: izenkevich@yandex.ru

Submitted 05 July 2023, received in revised form 19 August 2023

Chromatographic analysis of a series of two-component samples (solutions of a target analyte and a standard) allows simultaneous comparison of the possibilities and features of six variants of quantitative analysis using the external and internal standards techniques according to the criteria of results precision and repeatability (random and systematic errors values). These variants include the simplest version of the external standard method (I); its modified version (II) that implies the application of an additional standard and averaging not the absolute, but relative peak areas; the commonly used version of the internal standard method (III); and its version modified in a similar manner (IV). Besides, two variants of using a homologue of the target analyte as the internal standard without determining the calibration coefficients are considered (V) and (VI). This topic is of interest for optimization of practical works on chromatography and teaching the subject in general.

The requirements to the additional and internal standards are not identical. Any compound (both present in the samples or added to them) can be selected as the additional standards, and precise setting of their concentrations is not required. It is only necessary to ensure their equal concentrations in the analyzed and reference solutions. It is shown that the modified versions of the external and internal standard methods are characterized by the equal relative standard deviations of the results.

The minimal relative standard deviations of the results are typical for the variants implying the use of an additional (II) or an internal (IV) standard and the averaging the ratio of peak areas of target analytes and such standards. The systematic errors of determinations appeared to be minimal for the same variants. Controlling the values of the calibration coefficients is informative for revealing the possible distortions of the composition of samples due to the partial evaporation of volatile constituents in the course of handling such samples.

Keywords: Gas chromatography, quantitative analysis, methods of external and internal standards, comparison of different variants.

ВВЕДЕНИЕ. СПОСОБЫ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

Среди различных способов количественного хроматографического анализа принято выделять пять основных [1–4]:

1. Внешнего стандарта
2. Абсолютной градуировки
3. Внутреннего стандарта
4. Стандартной добавки
5. Внутренней нормализации

Перечисленные способы различаются неодинаковыми областями их применения, операциями подготовки проб, приготовления дополнительных образцов, а также алгоритмами обработки данных.

Каждый из способов может быть дополнительно подразделен на несколько вариантов. Попытка их классификации была предпринята в руководстве Й. Новака еще в 1978 г. [5], но не получила признания, прежде всего, из-за сложностей использованной автором символики. Однако проблема остается актуальной, особенно если принять во внимание, что в разных модификациях количественных определений оценки погрешностей результатов существенно различаются. Даже если ограничиться наиболее известными и часто используемыми способами внешнего и внутреннего стандартов, можно говорить о шести разных вариантах, что и сделано в настоящей работе. Рассматриваемые варианты обозначены далее как I–VI. Для упорядочения

используемой символики величины, относящиеся к анализируемым образцам, маркированы одним штрихом (например, C'), а к градуировочным – двумя (C''). Определяемые величины обозначены подстрочным символом «х», а относящиеся к компонентам, выбранным в качестве стандартов – символом «ст».

I. В простейшем варианте способа внешнего стандарта для определения концентрации известного аналита в характеризующем образце (C'_x) необходимо приготовить градуировочный раствор образца сравнения этого аналита с известной концентрацией ($C''_{ст}$). Тогда из простейшей пропорции получаем соотношение для определения C'_x :

$$C'_x = C''_{ст} \cdot \frac{\langle S'_x \rangle}{\langle S''_{ст} \rangle} \quad (1)$$

где $\langle S'_x \rangle$ и $\langle S''_{ст} \rangle$ – средние значения площадей пиков аналита в характеризующем и градуировочном образцах, соответственно.

Поскольку случайная составляющая погрешности задания концентрации $C''_{ст}$ обычно существенно меньше случайных составляющих погрешностей определения площадей хроматографических пиков, S'_x и $S''_{ст}$, то для оценки случайной составляющей относительной погрешности результата (δC_x , %) в первом приближении можно использовать простейшее соотношение:

$$\delta C'_x \approx [\delta S'^2_x + \delta S''^2_{ст}]^{1/2} \quad (2)$$

II. Соотношение (2) подтверждает, что основным источником случайных погрешностей определений способом внешнего стандарта являются погрешности определения абсолютных площадей хроматографических пиков. Если, например, они составляют 3–4 %, то ожидаемая относительная погрешность результатов не может быть менее 4–6 %. Такие погрешности нельзя устранить, но их можно в значительной степени минимизировать с учетом того, что вариации отношений площадей хроматографических пиков за счет ограниченной воспроизводимости дозирования существенно меньше вариаций абсолютных площадей. В модифицированном способе внешнего стандарта в результате использования дополнительных стандартов ($S''_{доп}$) абсолютные площади пиков заменяют относительными величинами [6–8]. Это приводит к следующим соотношениям:

$$C'_x = C''_{ст} \cdot \frac{\langle S'_x / S'_{доп} \rangle}{\langle S''_{ст} / S''_{доп} \rangle} \quad (3)$$

$$\delta C'_x \approx [\delta (S'_x / S'_{доп})^2 + \delta (S''_{ст} / S''_{доп})^2]^{1/2} \quad (4)$$

Важно заметить, что требования к дополнительным стандартам не эквивалентны требованиям к внутренним стандартам в соответствующем способе количественных определений. Прежде всего, их концентрации в характеризующем и градуировочном образцах могут оставаться неизвестными; важно обеспечить лишь их равенство. В качестве дополни-

тельных стандартов можно выбирать любые соединения (без ограничений их химической природы), в том числе уже присутствующие в качестве примесей в образцах. Интересной разновидностью этого варианта является возможность использования в качестве дополнительного стандарта растворителя [9]. Его содержание в характеризующем и градуировочном образцах, как правило, значительно превышает количества определяемых аналитов, так что можно принять $C'_{раств} \approx C''_{раств}$. Более того, как ни удивительно, сигналы растворителя можно использовать даже в тех случаях, когда их максимальная интенсивность искусственно ограничена приборными факторами [10].

III, IV. Суть способа внутреннего стандарта состоит в том, что к образцу, содержащему характеризующее соединение, добавляют известное количество другого компонента (внутреннего стандарта). Содержание аналита вычисляют в результате сравнения площадей пиков этих компонентов, предварительно охарактеризовав различия в чувствительности хроматографических детекторов в результате анализа дополнительно приготовленных градуировочных образцов. В большинстве руководств особое внимание обращают на условия выбора таких стандартов. Некоторый парадокс состоит в том, что часть из них тривиальна:

1. После добавления стандарта образец должен оставаться гомогенным;
2. Стандарт не должен реагировать с компонентами образца (это настолько естественно, что, казалось бы, даже не должно заслуживать упоминания);
3. Параметры удерживания стандарта не должны существенно отличаться от параметров удерживания аналита, но, в то же время,
4. Пик стандарта не должен перекрываться с пиками компонентов пробы;
5. Стандарт должен быть легко доступным;
6. Желательно, чтобы химическая природа аналита и стандарта была бы одинаковой;
7. Площади пиков стандарта и определяемого компонента не должны сильно отличаться одна от другой.

При этом такие перечни обычно не содержат рекомендаций «а как же все-таки выбрать внутренний стандарт?». На самом же деле ответ на такой вопрос достаточно прост: оптимальными внутренними стандартами являются гомологи определяемого соединения (с числом атомов углерода в молекуле меньшим или большим на единицу). Это условие обеспечивает выполнение пунктов №№ 1, 2, 3, 6 и, в значительной степени, № 5. Для экспериментальной проверки и (при необходимости) коррекции остаются всего два из них: № 4 и № 7.

Начать обсуждение обработки результатов анализа методом внутреннего стандарта целесообразно с известных рекомендаций. Например, в руководстве [1] для вычисления концентрации

определяемых компонентов пробы без комментариев рекомендовано следующее соотношение:

$$C'_x = [S'_x * M_{ст} * f_{x/ст}] / (M_{обр} * S'_{ст}) \quad (5)$$

где S'_x и $S'_{ст}$ – площади пиков определяемого компонента и внутреннего стандарта в характеризуемом образце, $M_{ст}$ и $M_{обр}$ – массы стандарта и образца, $f_{x/ст}$ – градуировочный коэффициент, компенсирующий различия в чувствительности детектора к аналиту и стандарту.

Отсутствие комментариев к основному расчетному уравнению не является особенностью этого руководства. В монографии [2] приведена практически такая же формула (после замены $C'_{ст} = M_{ст} / M_{обр}$ совпадает с соотношением (5)):

$$C'_x = C'_{ст} * f_{x/ст} * S'_x / S'_{ст} \quad (6)$$

В других источниках информации расчетные соотношения имеют аналогичный вид. Существенным элементом неопределенности соотношений (5) и (6) представляется отсутствие указаний на последовательности вычислений в случае обработки результатов не единичных определений, а их серий. От этого зависят оценки случайных составляющих погрешностей определений [11].

В реальной аналитической практике вместо площадей единичных пиков S'_x и $S'_{ст}$ используют их средние значения в сочетании с соответствующими стандартными отклонениями, $\langle S'_x \rangle \pm s(S'_x)$ и $\langle S'_{ст} \rangle \pm s(S'_{ст})$. Относительные стандартные отклонения равны $\delta S'_x = s(S'_x) / S'_x$ и $\delta S'_{ст} = s(S'_{ст}) / S'_{ст}$. Если формально следовать формулам (5) и (6), то по аналогии с соотношением (2) можно записать:

$$\delta C'_x \approx [\delta S'^2_x + \delta S'^2_{ст} + \delta f_{x/ст}^2]^{1/2} \quad (7)$$

При этом коэффициенты $f_{x/ст}$ должны быть определены предварительно. Для этого нужно приготовить образцы (растворы) с известными концентрациями характеризуемого компонента «х» и выбранного стандарта, $C''_{х,град}$ и $C''_{ст,град}$ и определить площади пиков $\langle S''_{х,град} \rangle$ и $\langle S''_{ст,град} \rangle$, после чего вычислить отношение:

$$f_{x/ст} = (\langle S''_{ст,град} \rangle * C''_{х,град}) / (\langle S''_{х,град} \rangle * C''_{ст,град}) \quad (8)$$

но тогда:

$$\delta f_{x/ст} \approx [\delta S''^2_{ст,град} + \delta S''^2_{х,град}] \quad (9)$$

Если подставить значение $\delta f_{x/ст}$ из формулы (9) в соотношение (7), получаем:

$$\delta C'_x \approx [\delta S'^2_x + \delta S'^2_{ст} + \delta S''^2_{ст,град} + \delta S''^2_{х,град}]^{1/2} \quad (10)$$

Вклады всех площадей пиков (четыре слагаемых под корнем) приблизительно одинаковы. Если сравнить соотношение (10) с формулой (2) для оценки случайной составляющей погрешности определений более простого способа внешнего стандарта, который, как принято считать, не отличается особой точностью, то там под корнем всего два слагаемых. Тогда получается, что случайная составляющая погрешности количе-

ственного анализа способом внутреннего стандарта должна быть в $\sqrt{2} \approx 1.4$ раза хуже (больше), чем в способе внешнего стандарта. Если так, то преимущества способа внутреннего стандарта неочевидны.

Причиной такого парадокса является отсутствие детальных комментариев к расчетным соотношениям способа внутреннего стандарта. Основная причина введения стандарта непосредственно в анализируемые образцы заключается именно в том, чтобы скомпенсировать разброс площадей пиков, обусловленный преимущественно погрешностями дозирования проб в хроматограф. Но это значит, что формулы (5), (6) и аналогичные им другие не отражают важнейшей особенности способа внутреннего стандарта: для каждой хроматограммы сначала нужно вычислить отношение площадей пиков аналита и стандарта ($S'_x / S'_{ст}$), а только потом усреднять эти отношения. Стало быть, формулу (6) нужно переписать в виде (11), выделив среднее значение $\langle S'_x / S'_{ст} \rangle$ в качестве отдельного «неразъемного» сомножителя:

$$C'_x = C'_{ст} * f_{x/ст} * \langle S'_x / S'_{ст} \rangle \quad (11)$$

Соотношение для градуировочного коэффициента также должно быть преобразовано аналогичным образом:

$$f_{x/ст} = (\langle S''_{ст,град} / S''_{х,град} \rangle) * (C''_{х,град} / C''_{ст,град}) \quad (12)$$

но тогда

$$\delta f_{x/ст} \approx \delta (S''_{ст,град} / S''_{х,град}) \quad (13)$$

и окончательно вместо соотношения (10) получаем иное выражение:

$$\delta C'_x \approx [\delta (S'_x / S'_{ст})^2 + \delta (S''_{ст,град} / S''_{х,град})^2]^{1/2} \quad (14)$$

Остается прокомментировать, чем же все-таки значения $\delta (S'_x / S'_{ст})^2$ «лучше» ($\delta S'^2_x + \delta S'^2_{ст}$). Как показала экспериментальная проверка [6], при дозировании проб объемом 0.5–1.0 мкл в хроматограф обычным шприцем на 10 мкл относительные стандартные отклонения отношений площадей пиков оказываются меньше сумм относительных стандартных отклонений абсолютных площадей каждого из пиков по отдельности в 6–30 раз. Таким образом, преимущества количественного анализа способом внутреннего стандарта заключаются в существенно меньшей случайной составляющей погрешностей определений, поскольку оценки $\delta C'_x$ по соотношению (14) меньше, чем, например, у способа внешнего стандарта [соотношение (2)].

V, VI. И, наконец, существует еще одна редко используемая разновидность количественного анализа способом внутреннего стандарта. Поскольку, как отмечено выше, оптимальными стандартами представляются гомологи целевых аналитов, то вполне обоснованно можно полагать, что во многих случаях (особенно для высших гомологов) значения $f_{x/ст}$ должны лишь незначительно отличаться от единицы. Тогда основные расчетные соотношения этого варианта оказываются такими же, как и в способе внешнего стандарта (I), однако значения S'_x и $S'_{ст}$ относятся уже не к разным образцам, а к одному

(характеризуемому). Здесь также можно выделить два варианта: первый предполагает усреднение абсолютных площадей пиков, а второй – их отношений:

Вариант V:

$$C'_x = C'_{ст} * \langle S'_x \rangle / \langle S'_{ст} \rangle \quad (15)$$

Вариант VI:

$$C'_x = C'_{ст} * \langle S'_x / S'_{ст} \rangle \quad (16)$$

Если в варианте (V) для оценки случайной составляющей погрешности определений можно использовать то же соотношение, что и в простейшем варианте способа внешнего стандарта (2), то в варианте (VI) оно существенно проще и эквивалентно относительному стандартному отклонению отношения площадей пиков аналита и стандарта:

Вариант V:

$$\delta C'_x \approx [\delta S'_x{}^2 + \delta S'_{ст}{}^2]^{1/2} \quad (17)$$

Вариант VI:

$$\delta C'_x \approx \delta(S'_x / S'_{ст}) \quad (18)$$

Простота последней формулы не означает, что этот способ является самым точным (минимальны значения случайной составляющей погрешности определений). Пренебрежение учетом градуировочных коэффициентов $f_{x/ст}$ закономерно приводит к существенному возрастанию трудно учитываемых систематических погрешностей. Именно по этой причине этот вариант находит лишь ограниченное применение.

Настоящая работа посвящена сравнительной характеристике перечисленных шести вариантов количественного анализа способами внешнего и внутреннего стандартов с использованием одних и тех же образцов, а именно:

- I. Простейший вариант способа внешнего стандарта;
- II. Модифицированный вариант способа внешнего стандарта;
- III. Стандартный вариант способа внутреннего стандарта;
- IV. Модифицированный вариант способа внутреннего стандарта;
- V. Использование гомолога в качестве внутреннего стандарта;
- VI. Модифицированный вариант использования гомолога в качестве внутреннего стандарта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление образцов. Образцы для количественного анализа вариантами I–VI готовили дозированием 10–30 мкл толуола ($T_{кип}$ 110.6 °C) и таких же количеств кумола ($T_{кип}$ 152.4 °C) (оба препарата – «ХЧ для хроматографии», «Реахим», Москва) в 2.0 мл изопропилового спирта («ХЧ», «Вектон», Санкт-Петербург). Для дозирования толуола и кумола использовали хроматографические шприцы вместимостью 10 и 50 мкл, спирта – медицинский шприц вместимостью 2 мл. Изопропиловый спирт в качестве растворителя выбран, чтобы

минимизировать искажения состава образцов за счет его частичного испарения в процессе работы. По сравнению, например, с *n*-гексаном он обладает не только большей температурой кипения (82.3 °C по сравнению с 68.7 °C), но и вдвое большей удельной теплотой испарения (0.76 кДж/г по сравнению с 0.37 кДж/г) и, при этом, меньшим индексом удерживания на стандартных неполярных фазах (489 ± 11 [12]).

Условия анализа. Газохроматографический анализ проводили на трех хроматографах «Хроматэк-Кристалл» 5000.2 с пламенно-ионизационными детекторами и идентичными WCOT-колонками (Macherey-Nagel, Германия) с неподвижной фазой HP-5 длиной 10 м, внутренними диаметрами 0.53 мм и толщиной пленки фазы 2.65 мкм при температуре 110 °C. Газ-носитель – азот, объемная скорость 3.8 мл/мин, линейная скорость 34 см/с, деление потоков 1 : 3. На четвертом хроматографе использовали колонку с аналогичной фазой ВРХ-5 длиной 30 м, внутренним диаметром 0.53 мм и толщиной пленки фазы 1.5 мкм при температуре 120 °C. Газ-носитель – азот, объемная скорость 5.0 мл/мин, линейная скорость 41.5 см/с, деление потока 1 : 3. На всех приборах температуры испарителей составляли 180 °C, детекторов 200 °C. Пробы дозировали микрошприцами вместимостью 10 мкл, объем проб 1.0 мкл, кратность дозирования образцов от 3 до 8 (среднее значение 4 ± 1).

Определения выполнены студентами бакалавриата Института химии Санкт-Петербургского государственного университета в качестве лабораторной работы к курсу лекций «Хроматографические методы разделения и очистки органических соединений». Подобный прием (привлечение студентов для характеристики новых вариантов количественных определений) был использован ранее для проверки возможностей модифицированного способа внешнего стандарта и стандартной добавки [10, 13, 14]. Такой подход при отсутствии заметных различий в квалификации участников обеспечивает именно параллельный, а не последовательный характер определений. Время выполнения работы составляло от 20 мин до 2 ч (среднее значение 70 ± 30 мин).

Обработка результатов. Статистическую обработку результатов определений проводили с использованием ПО Excel и Origin (версии 4.1 и 8.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе с использованием одних и тех же образцов сопоставлены характеристики шести вариантов количественного анализа способами внешнего и внутреннего стандартов, а именно:

- I. Простейший вариант способа внешнего стандарта. Основное расчетное соотношение (1); для оценки случайной составляющей погрешности определений используют соотношение (2);
- II. Модифицированный вариант способа внешнего стандарта (с вычислением и усреднением отношений площадей пиков); расчетные соотношения (3) и (4);

III. Наиболее известный вариант способа внутреннего стандарта. Расчетное соотношение (6), для вычисления градуировочного коэффициента используют соотношение (8), для оценки погрешности – соотношение (10);

IV. Модифицированный вариант способа внутреннего стандарта (с вычислением и усреднением отношений площадей пиков); соотношения (11), (12) и (13);

V. Использование гомолога в качестве внутреннего стандарта; соотношения (13) и (15);

VI. Модифицированный вариант использования гомолога в качестве внутреннего стандарта (с вычислением и усреднением отношений площадей пиков); соотношения (14) и (16).

Обсуждение результатов предполагает выявление конкретных вариантов количественных определений, отличающихся минимальными погрешностями, и, в итоге, оказывается достаточно кратким. Для сравнения всех вариантов были использованы сочетания одних и тех же характеризуемых и градуировочных образцов, содержащих известные концентрации толуола (аналит) и кумола (гомолог), рассматриваемого (в зависимости от варианта определений) либо как внутренний, либо как дополнительный стандарт. Концентрации толуола варьировали от 8.7 до 17.3 мг/мл, концентрации кумола в двух образцах были заданы одинаковыми (8.6 или 12.9 мг/мл), что необходимо для обеспечения возможности применения модифицированного способа внешнего стандарта. Результаты включают

вычисление относительных стандартных отклонений (оценки случайных составляющих погрешностей определений) и разностей найденных и заданных концентраций толуола (оценки систематических погрешностей).

Исходными данными для получения результатов всех указанных вариантов определений являлись следующие величины:

- Концентрации определяемого компонента и стандарта в характеризуемом (C'_x и C'_{ct}) и градуировочном (C''_x и C''_{ct}) образцах;
- Абсолютные площади пиков определяемого компонента и стандарта в тех же образцах (S'_x, S'_{ct}, S''_x и S''_{ct}) в сочетании с их стандартными отклонениями $s(S_i)$ и коэффициентами вариации $\delta S_i = s(S_i)/S_i$;
- Отношения площадей пиков определяемого компонента и стандарта в характеризуемом (S'_x/S'_{ct}) и градуировочном (S''_x/S''_{ct}) образцах и соответствующие им стандартные отклонения;

Для иллюстрации различий в использовании перечисленных величин подробные вычисления для образца № 2 (заданная концентрация толуола 17.3 мг/мл) приведены в табл. 1.

Из сравнения данных табл. 1 легко заключить, что варианты определений, предполагающие использование относительных площадей пиков (**II, IV и VI**) характеризуются заметно меньшими случайными составляющими погрешностей результатов (1.8 %, 1.8 % и 1.4 %, соответственно), чем варианты (**I, III и V**), основанные на абсолютных

Таблица 1

Иллюстрация отличий результатов количественных определений различными вариантами способов внешнего и внутреннего стандарта

Table 1

Illustration of differences between the results of quantitative determination for various modifications using the methods of external and internal standard

Характеризуемый образец	Градуировочный образец
Концентрации, C, мг/мл	
$C'_x = 17.3$ (определяемая величина)	$C''_x = 13.0$
$C'_{ct} = 12.9$	$C''_{ct} = 12.9$
Средние значения площадей пиков, $\langle S \rangle \pm s(S)$ (δS , %), мВ'мс	
$S'_x = 351990 \pm 13590$ (3.9 %)	$S''_x = 255340 \pm 8401$ (3.2 %)
$S'_{ct} = 274500 \pm 9529$ (3.5 %)	$S''_{ct} = 275122 \pm 9441$ (3.4 %)
Средние значения отношений площадей пиков, $\langle S_x/S_{ct} \rangle \pm s(S_x/S_{ct})$ ($\delta S_x/S_{ct}$, %)	
$\langle S'_x/S'_{ct} \rangle = 1.282 \pm 0.018$ (1.4 %)	$\langle S''_x/S''_{ct} \rangle = 0.968 \pm 0.012$ (1.2 %)
Результаты определений, C'_x ($\delta C'_x$, %), мг/мл	
$C'_x = 13.0 \cdot 351990 / 266340 = 17.2$ (4.7 %)	
$C'_x = 13.0 \cdot 1.282 / 0.968 = 17.2$ (1.8 %)	
$f_{x/ct} = (13.0 / 12.9) / (266340 / 275122) = 1.018$ (5.2 %)	
$C'_x = 12.9 \cdot 1.018 \cdot 351990 / 274500 = 16.8$ (7.4 %)	
$f_{x/ct} = (13.0 / 12.9) / 0.968 = 1.041$ (1.2 %)	
$C'_x = 12.9 \cdot 1.041 \cdot 1.282 = 17.2$ (1.8 %)	
$C'_x = 12.9 \cdot 351990 / 274500 = 16.5$ (4.9 %)	
$C'_x = 12.9 \cdot 1.282 = 16.5$ (1.4 %)	

Таблица 2

Характеристика погрешностей различных вариантов количественных определений способами внешнего и внутреннего стандарта

Table 2

Evaluation of errors for various methods of quantitative determination using the methods of external and internal standard

№	Заданная концентрация толуола, мг/мл	Определенная концентрация толуола, C_x , мг/мл (относительное стандартное отклонение, %)					
		I	II	III	IV	V	VI
1	13.0	12.1 (5.2 %)	13.4 (1.0 %)	13.2 (7.2 %)	13.4 (1.0 %)	13.2 (3.7 %)	13.2 (0.7 %)
2	17.3	17.2 (4.7 %)	17.2 (1.8 %)	16.8 (7.4 %)	17.2 (1.8 %)	16.5 (4.9 %)	16.5 (1.4 %)
3	17.3	16.6 (4.8 %)	16.9 (3.8 %)	16.9 (6.8 %)	16.9 (3.8 %)	16.2 (5.9 %)	16.2 (1.6 %)
4	11.1	10.4 (2.2 %)	11.8 (1.3 %)	11.8 (3.3 %)	11.8 (1.3 %)	10.9 (1.8 %)	10.9 (1.0 %)
5	8.7	8.7 (5.0 %)	10.0 (0.5 %)	9.8 (5.7 %)	10.0 (0.5 %)	8.6 (5.0 %)	8.7 (0.1 %)
6	8.7	8.7 (2.7 %)	9.1 (0.4 %)	9.1 (3.9 %)	9.1 (0.4 %)	7.0 (1.5 %)	7.0 (0.2 %)
7	17.3	18.6 (11.2 %)	17.4 (2.4 %)	17.5 (14.5 %)	17.4 (2.4 %)	15.6 (13.1 %)	15.5 (1.4 %)
8	10.5	10.6 (4.4 %)	10.6 (2.1 %)	10.4 (7.9 %)	10.5 (2.1 %)	7.9 (5.6 %)	7.9 (1.8 %)
9	13.0	12.7 (3.4 %)	12.3 (0.3 %)	12.3 (4.7 %)	12.3 (0.3 %)	11.2 (1.3 %)	11.2 (0.1 %)
10	13.0	12.3 (2.8 %)	12.3 (1.6 %)	12.3 (4.4 %)	12.3 (1.6 %)	11.0 (1.5 %)	11.0 (1.0 %)
11	16.1	16.4 (3.3 %)	16.2 (0.9 %)	16.3 (4.1 %)	16.3 (0.9 %)	13.0 (2.4 %)	13.0 (0.3 %)
12	13.0	11.0 (5.4 %)	12.7 (0.7 %)	12.7 (7.6 %)	12.7 (0.7 %)	10.9 (6.7 %)	12.9 (0.4 %)
Среднее относительное стандартное отклонение, %		4.6	1.4*	6.5	1.4	4.4	0.8
Среднее отклонение C_x от заданного значения, мг/мл		0.6	0.4	0.4	0.4	1.5	1.4

*) **Жирным шрифтом** выделены минимальные значения случайных и систематических погрешностей, указывающие на предпочтительные варианты определений.

площадей пиков (4.7 %, 7.4 % и 4.9 %, соответственно). Аналогичная картина наблюдается и для других образцов, данные для 12 из которых сопоставлены в табл. 2 в сочетании со средними значениями разностей определенных и заданных значений C_x ' (систематические погрешности) и средними значениями относительных погрешностей δC_x , %. Для сокращения объема таблицы и упрощения ее восприятия значения абсолютных погрешностей $s(C_x)$ не указаны. Данные табл. 2 ранжированы по увеличению сумм систематических погрешностей определений всеми шестью способами.

Так же как и для рассмотренного в табл. 1 единичного примера, сопоставление результатов нескольких определений подтверждает, что варианты, предполагающие использование относительных площадей пиков (II, IV и VI), характеризуются в 3–5 раз меньшими случайными составляющими погрешностей определений, чем варианты, основанные на использовании абсолютных площадей пиков. К ним относятся модифицированный способ внешнего стандарта (II, 1.4 %), модифицированный способ внутреннего стандарта (IV, 1.4 %) и способ, предполагающий выбор в качестве внутреннего стандарта гомолога без определения соответствующих градуировочных коэффициентов (VI, 0.8 %). Однако эти данные не следует рассматривать вне связи с систематическими погрешностями – средними значениями разностей определенных и заданных значений C_x ', которые минимальны (по 0.4 %) имен-

но для модифицированного способа внешнего стандарта (II) и всех вариантов метода внутреннего стандарта (III) и (IV).

Что же касается выбора в качестве внутреннего стандарта гомолога анализа без предварительного определения градуировочных коэффициентов, то для этих вариантов типичны наибольшие систематические погрешности (1.5 % и 1.4 %). Наиболее вероятно, что причиной таких погрешностей являются искажения состава образцов в процессе работы с ними за счет частичного испарения как растворителя, так и компонентов раствора. Дело в том, что варианты (I) – (IV) предусматривают анализ двух образцов (характеризуемого и градуировочного), когда искажения их состава за счет такого испарения хотя бы частично компенсируются. Варианты же (V) и (VI) предполагают анализ только единичных образцов, когда подобная компенсация принципиально невозможна.

Аналогичные выводы о частичном испарении образцов как основной причине увеличения систематических погрешностей результатов определений следуют из рассмотрения значений градуировочных коэффициентов. Прежде всего, следует отметить, что средние значения $f_{x/ст}$ в обычном (формула 8) и модифицированном (формула 12) вариантах способа внутреннего стандарта практически не отличаются (1.14 ± 0.10 и 1.15 ± 0.10 , соответственно). Однако в ходе последовательных анализов одних и тех же образцов отмечено их увеличение от 1.02–1.04

до 1.30–1.32. Подобная тенденция обусловлена тем, что в формулах (8) и (12) для вычисления $f_{x/ст}$ площади пиков определяемого компонента S''_x (толуол) находятся в знаменателе. Следовательно, частичное испарение этого более летучего по сравнению со стандартом (кумол) компонента приводит к увеличению значений $f_{x/ст}$. Этот факт вполне можно использовать для контроля степени искажения состава проб, содержащих летучие компоненты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сопоставление случайных и систематических погрешностей результатов анализа одних и тех же образцов с использованием различных вариантов количественных определений способами внешнего и внутреннего стандартов позволяет выявить из них наиболее предпочтительные по критериям точности. К ним относятся модифицированные варианты этих методов. Первый из них предполагает введение дополнительных стандартов в анализируемый и градуировочный образцы с целью замены абсолютных площадей пиков целевых аналитов соответствующими относительными площадями. Второй способ не предполагает изменений экспериментальных операций, но также предусматривает первоначальное вычисление относительных площадей пиков с их последующим усреднением.

Сравнение различных вариантов определений позволило выявить важную особенность модифицированных способов внешнего и внутреннего стандартов, остававшуюся не отмеченной ранее. Сравнение формул (4) и (14) для оценки случайных составляющих погрешностей этих вариантов показывает, что они идентичны, несмотря на то, что требования к дополнительному и внутреннему стандартам неодинаковы. Этот факт подтверждается данными Табл. 2, в которой все случайные составляющие погрешностей в столбцах, соответствующих способам (II) и (IV), равны между собой.

Последнее замечание касается организации самой работы. Результаты хроматографического анализа всего двух двухкомпонентных образцов позволяют охарактеризовать шесть различных вариантов количественных определений способами внешнего и внутреннего стандартов. Этот факт представляет интерес для организации практических работ по хроматографии и процесса обучения в целом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Практическая работа, результаты которой составили предмет настоящего сообщения, выполнена с использованием оборудования Ресурсного Центра «Методы анализа состава вещества» Санкт-Петербургского государственного университета. Авторы благодарят сотрудников Центра за содействие.

ACKNOWLEDGEMENTS

The students' work, which results are discussed in this paper, was carried out at the Center for Chemical and Material Research of St. Petersburg State University's Research Park. The author is grateful to the staff of this Center for the assistance.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по газовой хроматографии: в 2 ч.; пер. с нем. Ч. 2/ ред.: Э. Лейбниц, Х.Г. Штруппе. М.: Мир, 1988. 510 с.
2. Количественная газовая хроматография: в 2 ч. Ч. 2/ Гишон Ж., Гийемен К. М.: Мир, 1991. 376 с.
3. Практическое руководство для лабораторий. Специальные методы: пер. с нем./ В.Р. Лесс [и др.]. СПб.: Профессия, 2011. 471 с.
4. Аналитическая химия. Методы разделения и гибридные методы анализа / под ред. Л.Н. Москвина. СПб.: Лань, 2019. 332 с.
5. Новак Й. Количественный анализ методом газовой хроматографии. М.: Мир, 1978. 180 с.
6. Зенкевич И.Г., Прокофьев Д.В. Уменьшение погрешностей хроматографического анализа методами внешнего стандарта и стандартной добавки за счет использования дополнительных стандартов // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19, № 4. С. 302-309.
7. Зенкевич И.Г., Прокофьев Д.В. Использование дополнительных стандартов для повышения точности методов количественного хроматографического анализа // Ж. аналит. химии. 2017. Т. 72, № 5. С. 437-447.
8. Зенкевич И.Г., Прокофьев Д.В. Особенности использования дополнительных стандартов в количественном хроматографическом анализе // Сорбционные и хроматографические процессы. 2017. Т. 17, № 2. С. 228-242.
9. Зенкевич И.Г., Прокофьев Д.В. Уменьшение случайных погрешностей количественного хроматографического анализа при использовании растворителя в качестве дополнительного стандарта // Аналитика и контроль. 2016. Т. 20, № 2, С. 147-153.
10. Уменьшение случайной составляющей погрешности количественных газохроматографических определений способом внешнего стандарта за счет использования сигнала растворителя / И.Г. Зенкевич [и др.] // Аналитика и контроль. 2022. Т. 26, № 2. С. 141-149.
11. Зенкевич И.Г. О некоторых редко обсуждаемых парадоксах количественного хроматографического анализа // Лаборатория и производство. 2021. Т. 18, № 3-4. С. 22-28.
12. The NIST Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH EI MS Library, 2017 Release). Software/Data Version; NIST Standard Reference Database, Number 69, August 2017. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899:[Электронный ресурс]: <http://webbook.nist.gov> (дата обращения – июнь 2023г.).
13. Сравнительная характеристика возможностей количественного газохроматографического анализа обычным и модифицированным методами внешнего стандарта / И.Г. Зенкевич [и др.] // Аналитика и контроль. 2019. Т. 23, № 2. С. 223-228.
14. Сравнительная характеристика различных вариантов количественного хроматографического анализа методом двойной стандартной добавки / И.Г. Зенкевич [и др.] // Аналитика и контроль. 2021. Т. 25, № 2. С. 146-154.

REFERENCES

1. E. Leibnitz, H.G. Struppe. *Handbuch der Gaschromatographie*. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Porting K.-G., 1984, vol. 2.
2. Guiochon G., Guillemin C. *Quantitative gas chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 1988, vol. 1, 2.
3. Less W.R., Eckhardt S., Kettner M., Schmitt F., Walter B. *Die handlungsorientierte Ausbildung für Laborberufe. Band 2. Waldqualifikationen*. Würzburg: Vogel Business Media GmbH & Co K.-G., 2010.
4. *Analytical chemistry. Separation and hyphenated analytical methods*. Ed. L.N. Moskvina. St. Petersburg: Lan' Publ., 2019.
5. Novak J. *Quantitative analysis by gas chromatography*. New York: Marcel Dekker Inc., 1975, 130 p.
6. Zenkevich I.G., Prokofiev D.V. [Decreasing the uncertainty of chromatographic analysis by methods of external standard and standard addition using additional standards]. // *Analitika i Kontrol' [Analytical and Control]*, 2015, vol. 19, no. 4, pp. 302-309. doi: 10.15826/analitika.2015.19.4.007. (In Russian).
7. Zenkevich I.G., Prokofiev D.V. Using additional standards for increasing the accuracy of quantitative chromatographic analysis // *Rus. J. Anal. Chem.*, 2017, vol. 72, no. 5, pp. 509-518. doi: 10.1134/S1061934817050136.
8. Zenkevich I.G., Prokofiev D.V. [Features of additional standards using in quantitative chromatographic analysis]. // *Sorbtsionnye and Khromatograficheskie Protssessy [Sorption and Chromatogr. Processes]*, 2017, vol. 17, no. 2, pp. 228-242. (In Russian).
9. Zenkevich I.G., Prokofiev D.V. [Decreasing the uncertainty of quantitative chromatographic analysis using solvent as additional standard] // *Analitika i Kontrol' [Analytical and Control]*, 2016, vol. 20, no. 2, pp. 147-153. doi: 10.15826/analitika.2016.20.2.005. (In Russian).
10. Zenkevich I.G., Byvsheva S.V., Gerasimov A.I., Gladnev S.V., Grigoriev M.V., Gubina N.V., Didenko E.A., Kazantzev A.S., Kalutskaia T.D., Katernuk E.V., Koblova A.A., Krutin D.V., Malkova K.P., Metliaeva S.A., Odegova V.S., Smirnova D.S., Spivakovskiy V.A., Terno P.V. [Decreasing the uncertainty of gas chromatographic quantification using the solvent's signal in the method of external standard]. *Analitika i Kontrol' [Analytical and Control]*, 2022, vol. 26, no. 2, pp. 141-149. doi: 10.15826/analitika.2022.26.2.005. (In Russian).
11. Zenkevich I.G. [About some rarely discussed problems of quantitative chromatographic analysis]. *Laboratoria i proizvodstvo [Laboratory & Industry]*, 2021, vol.18, no. 3-4, pp. 22-28. doi: 10.3275/2619-0921.2021.3-4.18.22.28. (In Russian).
12. The NIST Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH EI MS Library, 2017 Release). Software/Data Version; NIST Standard Reference Database, Number 69, August 2017. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899: <http://webbook.nist.gov> (Accessed: June 2023).
13. Zenkevich I.G., Devleshova N.A., Krivolapova Yu.V., Moskvichev D.O., Rubicheva L.G., Tyufiyakov N.Yu. [Comparative characterization of quantitative gas chromatographic analysis capabilities using basic and modified external standard methods]. *Analitika i Kontrol' [Analytical and Control]*, 2019, vol. 23, no. 2, pp. 223-228. doi: 10.15826/analitika.2019.23.2.007. (In Russian).
14. Zenkevich I.G., Barkhatova D.D., Belysheva M.N., Kaminskii N.A., Karchuganova E.M., Klaving A.V., Kovalenko A.A., Krivovicheva V.S., Kuz'min A.A., Mel'nik M.V., Paramonova P.S., Popov R.A., Potapenkov V.V., Rashevskii A.A., Sysoeva A.A., Fedorova I.I., Firsov A.A. [Comparative characterization of different kinds of chromatographic quantification using the double standard addition method]. *Analitika i Kontrol' [Analytical and Control]*, 2021, vol. 25, no. 2, pp. 146-154. doi: 10.15826/analitika.2021.25.2.010. (In Russian).