



Современные аспекты хроматографии

Сравнение методов калибровок в хроматографии

**Минажева Гулшарат Салауатовна – доктор педагогических наук,
кандидат химических наук, профессор кафедры АКХиТРЭ**

Методы калибровок в хроматографии

Нормализация – процентное содержание аналита рассчитывают делением площади его пика на сумму всех площадей пиков на хроматограмме (МСД – *масс-спектрометрический детектор* или ПИД – *пламенно-ионизационный детектор*)

Калибровка по внутреннему стандарту: $S = f(C)$

Калибровка по внешнему стандарту: $S/S_{\text{BC}} = f(C/C_{\text{BC}})$.

Метод добавок: $S = f(C_{\text{доб.}})$.

Преимущества метода калибровки по внутреннему стандарту

-Контроль потерь при пробоподготовке. При потере анализа также теряется внутренний стандарт (добавляется ко всем образцам и в известной концентрации) , соотношение их концентраций остается неизменным.

-Отсутствует необходимость контроля объемов. Контроль чувствительности прибора. При использовании внутреннего стандарта не требуется точное дозирование объемов образцов и растворов стандартов. Потому, что в процессе анализа концентрация анализа в каждом образце определяется относительно концентрации внутреннего стандарта. *Таким образом*, если при дозировании образцов произошло некоторое отклонение, оно будет скомпенсировано во всех образцах, так как концентрация внутреннего стандарта остается постоянной. И это позволяет минимизировать ошибки, связанные с точностью дозирования образцов и растворов стандартов, так как внутренний стандарт используется для коррекции и компенсации таких отклонений.

-При увеличении чувствительности прибора возрастает как сигнал анализа, так и сигнал внутреннего стандарта (пропорционально). Внутренний стандарт позволяет контролировать чувствительность и стабильность аналитического прибора на протяжении всего анализа. Поскольку внутренний стандарт добавляется в каждый образец, любые изменения в чувствительности прибора будут отображаться на результатах анализа. *Таким образом*, использование метода калибровки по внутреннему стандарту упрощает процесс анализа, делая его менее зависимым от точности и объемов добавляемых реагентов, а также обеспечивает более надежные результаты благодаря контролю чувствительности прибора.

Калибровка по внутреннему стандарту (1)

- Приготовить калибровочные растворы с разной концентрацией аналита.
- В каждый калибровочный раствор внести одинаковую концентрацию внутреннего стандарта.
- Внести такую же концентрацию внутреннего стандарта в анализируемый образец.
- Проанализировать калибровочные и исследуемые образцы.
- Найти сигналы аналита (S_a) и внутреннего стандарта (S_{is})

Калибровка по внутреннему стандарту (2)

- Рассчитать отношение S_a/S_{is} для каждого образца.
- По результатам анализа калибровочных образцов построить зависимость $S_a/S_{is} = f(C_a)$.
- По калибровочной зависимости определить концентрацию аналита в исследуемом образце.

Задача

Необходимо определить концентрацию диурона (дибензофуран-гербицид) в образце воды методом ЖХ-МС. В качестве внутреннего стандарта был использован кофеин, добавляемый во все образцы в концентрации 100 мкг/л.

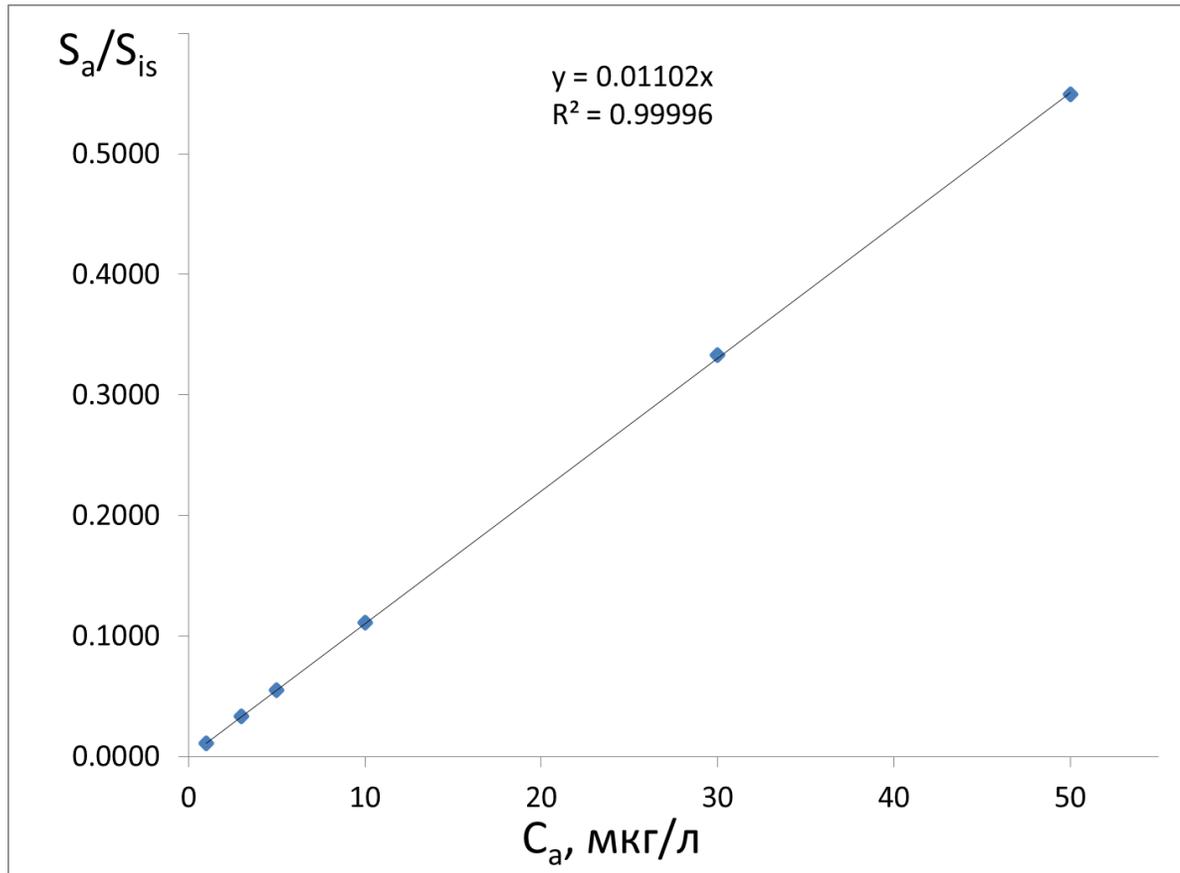
Анализ калибровочных образцов концентрациями: 1, 3, 5, 10, 30 и 50 мкг/л показали следующие площади пика диурона: 61, 266, 439, 712, 2344, 3999 у.е.

Площади пика кофеина составили 5569, 8014, 8014, 6425, 7036, 7280 у.е.

Площади пиков диурона и кофеина на хроматограмме исследуемого образца составили 3649 и 7225 у.е., соответственно.

Расчеты

C (диурон), мкг/л	S (диурон), у.е.	S (кофеин), у.е.	S (диурон)/ S (кофеин)
1	61	5569	0,0110
3	266	8014	0,0332
5	439	8014	0,0548
10	712	6425	0,1108
30	2344	7036	0,3331
50	3999	7280	0,5493



Коэффициент детерминации R^2 принимает значения от 0 до 1.

Он показывает долю дисперсии зависимой переменной, которая может быть объяснена или предсказана независимой переменной (или набором независимых переменных) в регрессионной модели.

Чем ближе значение R^2 к 1, тем лучше модель соответствует данным и тем больше вариации зависимой переменной объясняется независимыми переменными в модели. Если $R^2=0$, это означает, что независимые переменные не объясняют никакой вариации зависимой переменной, а если $R^2=1$, это означает, что все вариации зависимой переменной могут быть объяснены независимыми переменными.

Детерминация является важной метрикой для оценки качества регрессионных моделей и их способности предсказывать значения зависимых переменных.

В уравнении $y = 0,01102x + 0,012$:

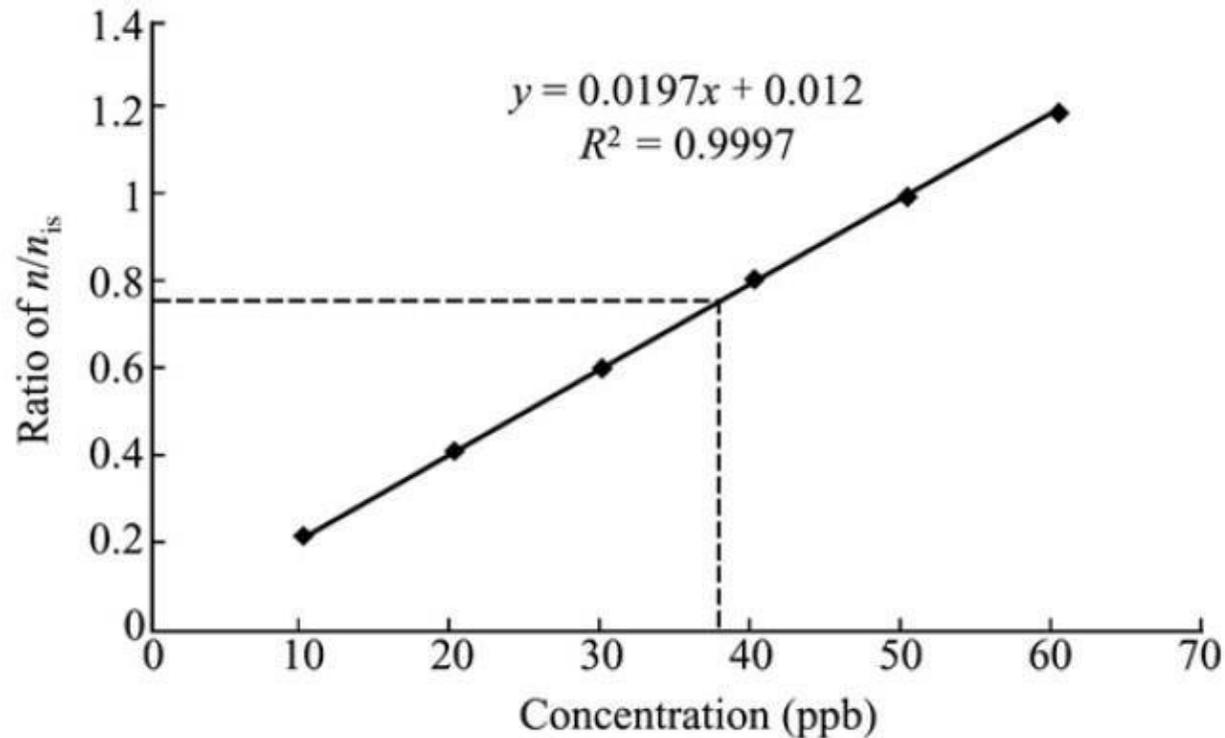
- «у» обозначает измеренное значение, которое вы получили в результате анализа.
- «х» обозначает концентрацию аналита, которую вы измеряли или которая была добавлена в ваш образец как внутренний стандарт.

Уравнение $y = 0,01102x + 0,012$ является уравнением линейной регрессии, где:

- $0,01102$ - это угловой коэффициент (наклон) линии регрессии. Он показывает, насколько изменится измеренное значение «у» при изменении на одну единицу концентрации аналита «х».
- $0,012$ - это коэффициент сдвига, который указывает на то, что линия регрессии не проходит через начало координат.

$R^2 = 0,99996$ представляет собой коэффициент детерминации, который измеряет, насколько хорошо ваше уравнение регрессии соответствует данным. Значение R^2 близкое к 1 (в данном случае $0,99996$) указывает на высокую степень соответствия модели данным, что означает, что ваша модель хорошо описывает зависимость между измеренными значениями «у» и концентрацией аналита «х».

Калибровка по внутреннему стандарту



К смеси, определяемой по методу внутреннего стандарта, добавляется определенное количество стандартного вещества.

Калибровочный график - связь (зависимость) между соотношением % содержания (концентрации) компонента и высоты (или площади) пиков данного компонента и стандартного вещества.

Регрессия - это статистический метод анализа данных, который используется для изучения отношений между переменными. Он помогает понять, как одна или несколько независимых переменных влияют на зависимую переменную.

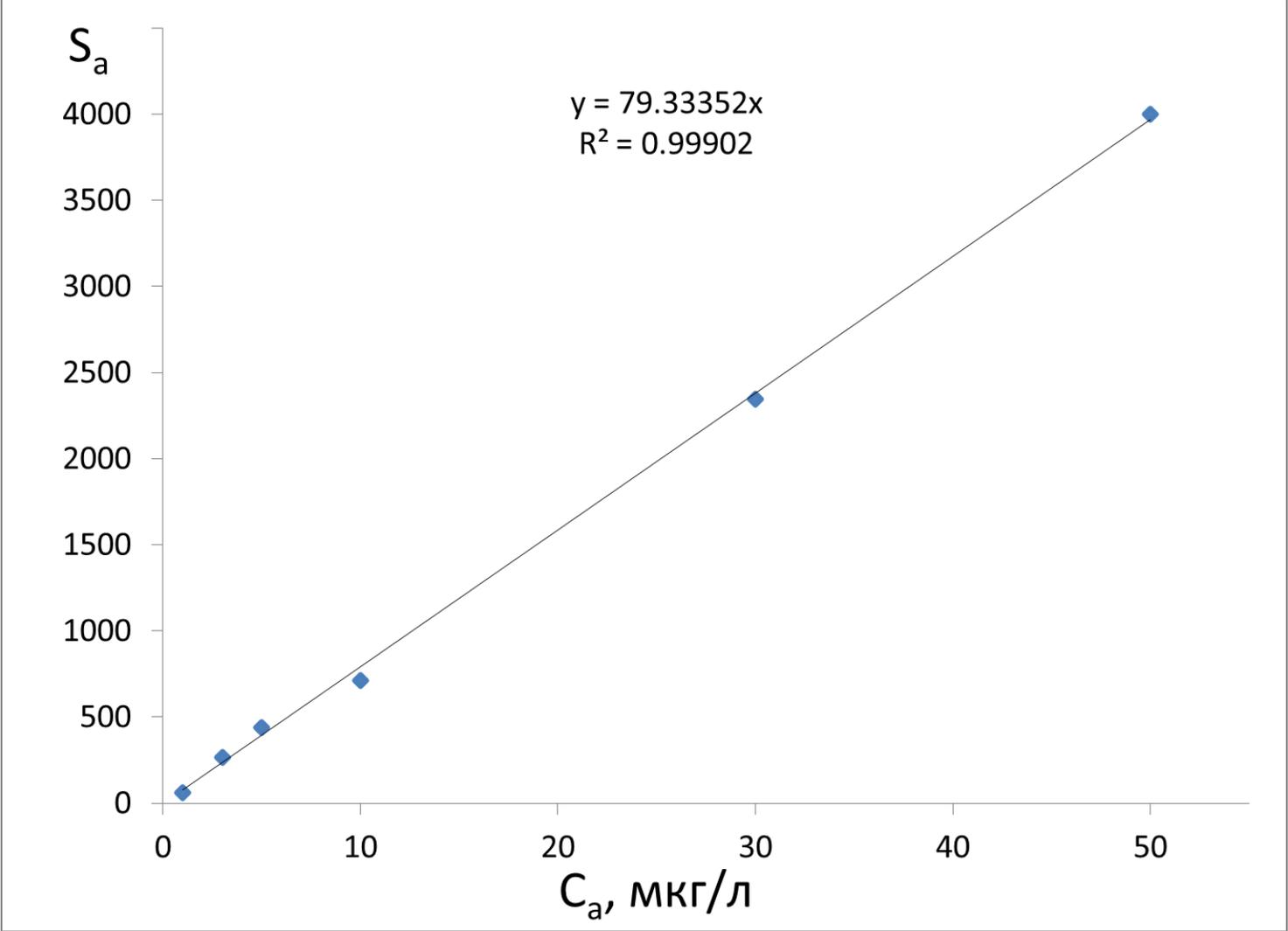
Основная идея *регрессии* заключается в том, чтобы определить математическую модель или уравнение, которое наилучшим образом описывает связь между независимыми и зависимой переменными.

Затем это уравнение может использоваться для прогнозирования значений зависимой переменной на основе известных значений независимых переменных.

В основе *регрессии* лежит предположение о том, что между переменными существует некоторая функциональная зависимость.

Регрессионные модели могут быть линейными или нелинейными, в зависимости от того, как они описывают отношения между переменными.

Регрессионный анализ широко используется в различных областях, включая экономику, социологию, медицину, инженерные и научные исследования, чтобы понять и предсказать поведение и результаты исследуемых явлений.



Метод наименьших квадратов

- Используется для построения линейной зависимости:

- $S = \alpha C + b$

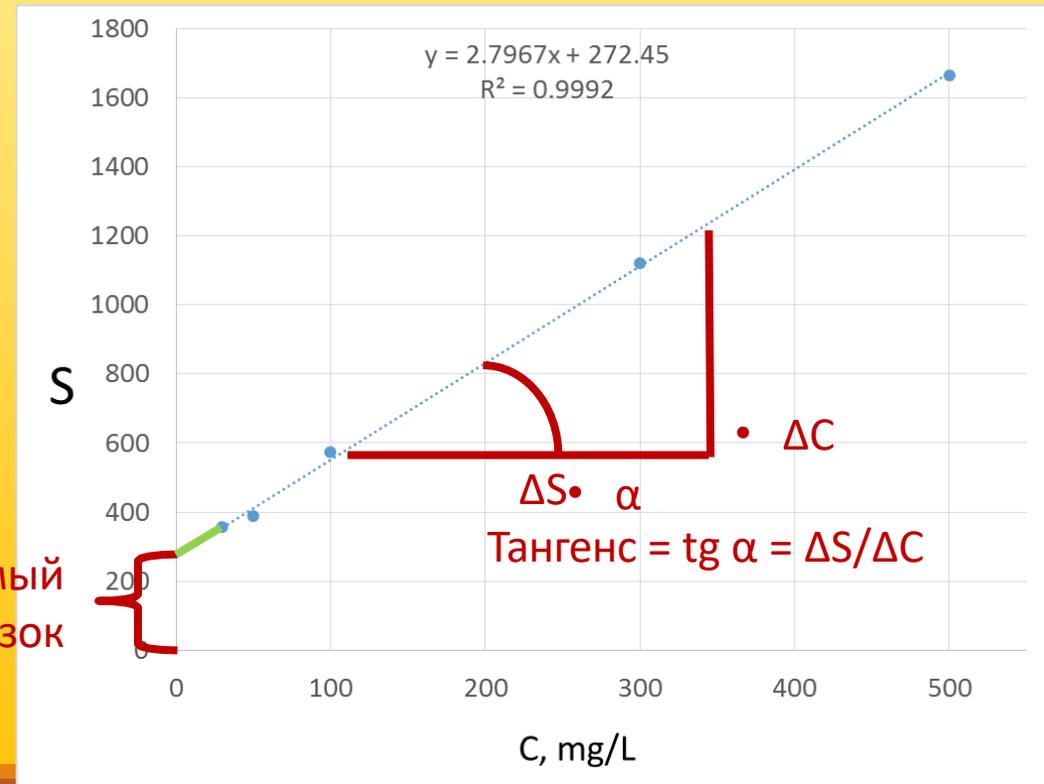
α – тангенс ($\Delta S / \Delta C$)

b – отсекаемый отрезок S –

сигнал

C – концентрация

Отсекаемый
отрезок



Метод наименьших квадратов в MS Excel

G3		✕ ✓ fx		{=ЛИНЕЙН(C3:C7;B3:B7;ИСТИНА;ИСТИНА)}				
	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2		C, ug/L	S	SD			Slope	Intercept
3		30	356.6	13.3		Parameter	2.797	272
4		50	390.1	35		SD	0.046	12
5		100	572.6	37.2		R2	0.9992	19 Sy
6		300	1119.8	63.8				
7		500	1663.9	186.7				

Используйте функцию “ЛИНЕЙН” или “LINEST”:

- 1) Выберите массив ячеек размером 2x3;
- 2) Введите формулу, задайте диапазон значений Y и X;
- 3) Третью переменную задайте «Ложь», если прямая проходит через (0;0);
- 4) Нажмите и держите клавиши “SHIFT+CTRL”, нажмите “ENTER”.

$$\text{Уравнение: } S = (2.797 \pm 0.046) \times C + (272 \pm 12)$$

H5


 $\{=ЛИНЕЙН(E5:E10,B5:B10,ЛОЖЬ,ИСТИНА)\}$

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
1															
2		Данные							Расчеты						
3	Калибровка							Внутренний стандарт				Внешний стандарт			
4		C (диурон), мкг/л	S (диурон), у.е.	S (кафеин), у.е.	S(диурон)/ S (кафеин)			Тангенс	Отрезок			Тангенс	Отрезок		
5		1	61	5569	0.0110		Параметр	0.01101911	0			79.33	0		
6		3	266	8014	0.0332		Станд. отклон. (CO)	0.000024	#Н/Д			0.82	#Н/Д		
7		5	439	8014	0.0548		R ²	1.0000	0.00140138	Sy		0.9995	48.721202	Sy	
8		10	712	6425	0.1108										
9		30	2344	7036	0.3331		Относит. CO, %	0.21				1.03			
10		50	3999	7280	0.5493		Уравнение: $S_d/S_{is} = (0,011019 \pm 0,000024) C$					S = (79,33 ± 0,82) C			
11															
12	Анализ														
13			3649	7225	0.5051		Концентрация диурона, мкг/л	45.8				46.0			

Метод изотопного разбавления

В каждый анализируемый образец вводят изотопно-меченый (маркированный) аналит.

По хроматограмме определяют соотношение пиков аналита и изотопно-меченого внутреннего стандарта.

Концентрацию аналита находят умножением концентрации изотопно-меченого внутреннего стандарта на рассчитанное соотношение.

Данный метод применяется в хроматографии, особенно в качестве способа калибровки и определения концентрации веществ в образцах. Его отличие от метода внутреннего стандарта заключается в том, как они используют маркированные соединения:

Метод изотопного разбавления: к образцу добавляется изотопно маркированное вещество, и его концентрация известна. Затем происходит разбавление образца, и изменение концентрации исходного вещества в образце измеряется с использованием аналитических методов. Сравнение изменения концентрации с известной концентрацией маркированного вещества позволяет определить начальную концентрацию исходного вещества.

Метод внутреннего стандарта: в образец добавляется известное количество внутреннего стандарта, который химически аналогичен анализируемому веществу, но отличается по массе или структуре. Это позволяет компенсировать потери образца при подготовке и анализе. Концентрация внутреннего стандарта исследуется вместе с образцом, и концентрация исходного вещества определяется по отношению к концентрации внутреннего стандарта.

Т.о., оба метода используют маркированные соединения, они применяются **для различных целей** и имеют **разные принципы работы**. Метод изотопного разбавления чаще используется для анализа концентрации веществ в образцах, в то время как метод внутреннего стандарта обеспечивает компенсацию потерь и точность анализа.

Метод изотопного разбавления - это аналитический метод, который используется для измерения концентрации определенных химических веществ в образцах.

Этот метод основан на принципе добавления известного количества изотопно маркированного вещества (*обычно стабильного изотопа*) к образцу и последующем измерении изменения концентрации интересующего вещества.

Процесс включает в себя следующие шаги:

1. Маркирование образца: Изотопно маркированное вещество добавляется к образцу. Это изотопное маркирование может быть проведено различными способами, например, путем добавления изотопно маркированного стандарта или использованием маркированных реагентов.

2. Разбавление образца: После добавления маркированного вещества образец разбавляется до определенного объема или концентрации.

3. Измерение концентрации: После разбавления образца происходит измерение концентрации интересующего вещества с использованием различных аналитических методов, таких как спектрофотометрия, хроматография или масс-спектрометрия.

4. Вычисление концентрации: Концентрация исходного вещества в образце вычисляется с учетом добавленного маркированного вещества и степени его разбавления.

Метод изотопного разбавления широко используется в аналитической химии, биохимии, фармацевтической и медицинской промышленности для точного определения концентрации веществ в образцах. Он обладает высокой чувствительностью, точностью и способностью к калибровке, что делает его полезным инструментом для многих научных и прикладных исследований.

Задача на точность

- Для проверки точности методики образец экстракта из воды, содержащий триазол концентрацией 15 пг/мкл и внутренний стандарт (пиридин) концентрацией 50 пг/мкл, проанализировали на ГХ-МС. Площади пиков триазола и пиридина составили 75 и 2,5 у.е., соответственно. Рассчитать и сравнить точности методов внешнего и внутреннего стандартов.

Калибровка представлена на следующем слайде.

Концентрации пиридина во всех калибровочных образцах составляет 50 пг/мкл

Задача - калибровка

Ca, пг/мкл	S _a	S _{is}	S _a /S _{is}
1	5.21	2.496	2.087
2	8.56	2.069	4.138
5	29.2	2.930	9.965
10	45.4	2.168	20.94
30	142.2	2.261	62.88
50	206	2.106	97.8
	$S = 4.303 C_a$		$S_a/S_{is} = 1.996 C_a$

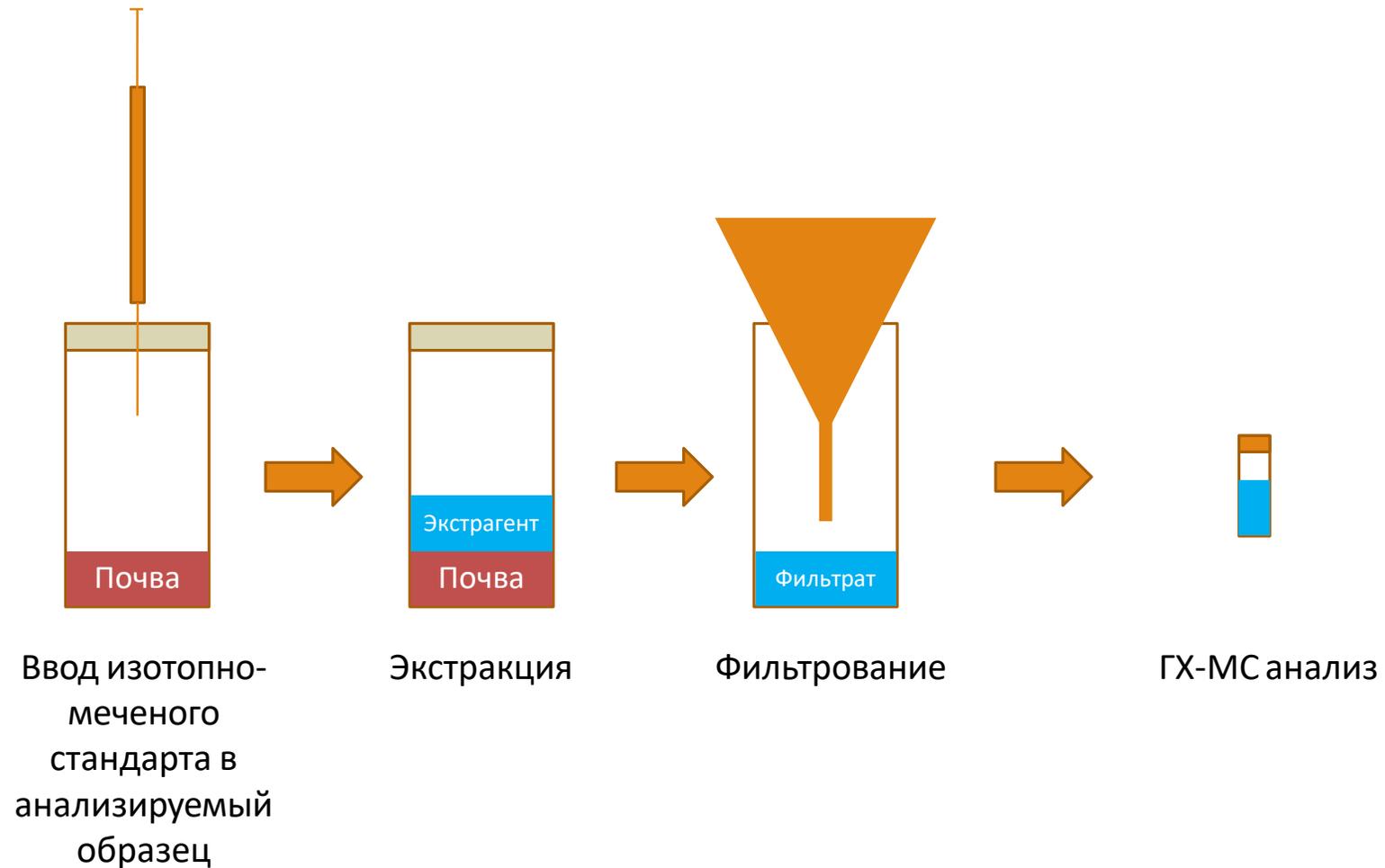
Задача – расчеты и выводы

C_a , пг/мкл	S_a	S_{is}	S_a/S_{is}	Внешний стандарт		Внутренний стандарт	
				$C_{найд.}$, пг/мкл	Точность, %	$C_{найд.}$, пг/мкл	Точность, %
15	75	2.5	30	17.4	116	15.0	100.2

Выводы:

- Методом внешнего стандарта найденная концентрация ~ на 20% превысила известную, что было вызвано регистрацией завышенной (на 20%) площади пика аналита.
Вероятная причина – введение большего объема пробы в колонку.
- Однако на 20% также повысилась площадь пика внутреннего стандарта, в результате чего соотношение откликов аналита и внутреннего стандарта осталось максимально близким к истинному значению, как и найденная методом внутреннего стандарта концентрация аналита.

Ход анализа методом изотопного разбавления



Пример

В образец почвы массой 1,00 г внесли 10 мкл раствора дейтерированного метилтриазола концентрацией 216 мг/л, после чего экстрагировали двумя порциями по 10,0 мл ацетона, фильтровали и анализировали методом ГХ-МС. Найти концентрацию метилтриазола в почве, если площади пиков аналита и внутреннего стандарта составили 25000 и 8000, соответственно.

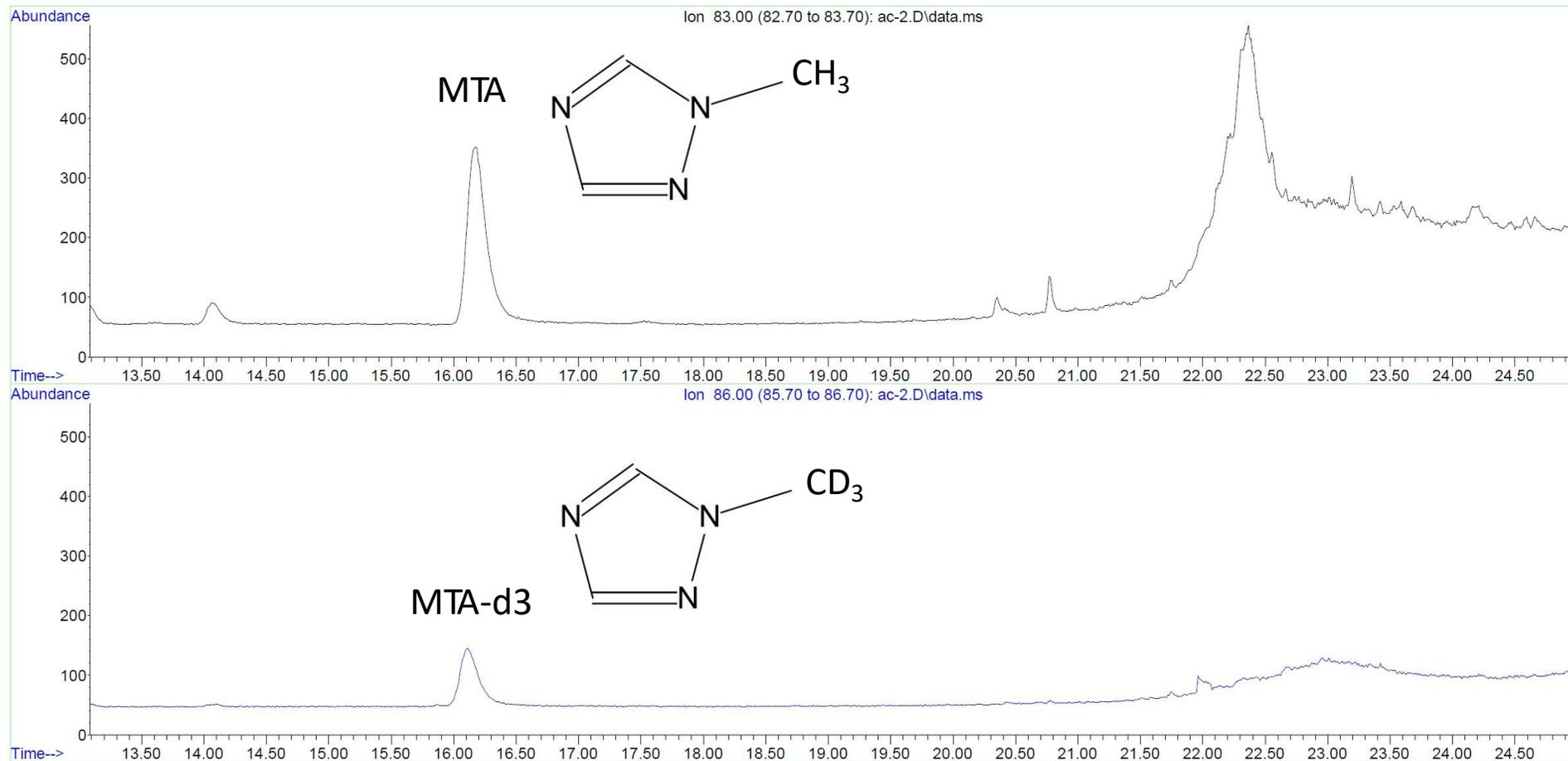
Дейтерированный метилтриазол (также известный как дейтерированный метил-1,2,3-триазол) - это органическое соединение, которое является дейтерированной (т.е. содержащей изотоп дейтерия) формой метилтриазола.

Метилтриазол - это азольное соединение, содержащее атомы азота и углерода в своей структуре. Он широко используется в органическом синтезе, фармацевтике, и как компонент в различных промышленных процессах.

Дейтерий - это изотоп водорода, содержащий один протон и один нейтрон в ядре (в отличие от обычного водорода, который содержит только один протон). Дейтерий является стабильным и обычно используется в химических исследованиях, чтобы помочь в определении структуры и свойств соединений.

Дейтерированный метилтриазол обычно используется в маркировке и маркированных соединениях для исследовательских целей, включая изучение реакций и определение структуры молекул в химических исследованиях. Использование дейтерированных соединений позволяет исследователям отслеживать перемещение атомов в молекуле и изучать реакционные механизмы и кинетику более эффективно.

Хроматограммы по ионам 83 и 86



Решение

$$C_{MTA} = \frac{C_{MTA-d3} \times S_{MTA}}{S_{MTA-d3}}$$

где C_{MTA-d3} – концентрация внутр. стандарта в почве

S_{MTA} – площадь пика аналита

S_{MTA-d3} – площадь пика внутр. стандарта

Решение

$$C_{MTA-d3} = \frac{C_{ss(MTA-d3)} \times V_{ss(MTA-d3)}}{m_s}$$

где $C_{ss(MTA-d3)}$ – концентрация раствора МТА-d3

$V_{ss(MTA-d3)}$ – объем введенного раствора МТА-d3

m_s – масса почвы, г

Решение

$$C_{MТA-d3} = \frac{216 \frac{\text{мг}}{\text{л}} \times 10 \text{ мкл}}{1 \text{ г}} = \frac{2160 \text{ мг мкл}}{\text{г } 10^6 \text{ мкл}} = 2,16 \frac{\text{мг}}{\text{кг}}$$

$$C_{MТA} = \frac{2,16 \frac{\text{мг}}{\text{кг}} \times 25000}{8000} = 6,75 \frac{\text{мг}}{\text{кг}}$$

Каковы основные преимущества метода изотопного разбавления?

Метод изотопного разбавления имеет несколько основных преимуществ:

1. Высокая чувствительность: Этот метод обладает высокой чувствительностью к измерению концентраций различных веществ, особенно в сложных смесях.

2. Высокая точность: Изотопное разбавление позволяет достичь высокой точности измерений, что важно для определения даже самых малых количеств веществ в образцах.

3. Селективность: Этот метод позволяет проводить селективное измерение конкретных компонентов в смеси, минимизируя влияние других соединений.

4. Возможность разделения: Изотопы химических элементов обладают специфическими характеристиками, что позволяет проводить их разделение и анализ в сложных образцах.

5. Широкий спектр применения: Метод изотопного разбавления используется в различных областях, включая химию, биологию, медицину, экологию и другие.

6. Методика трассировки: Изотопное разбавление часто используется для маркировки и трассировки (*отслеживание перемещения*) химических соединений в различных процессах и системах, что позволяет исследовать их поведение и пути распространения.



ВОПРОСЫ ???