

УДК: 543.544.45:54.062:543.05

## НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МЕТОДОМ ДВОЙНОГО ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА

**И.Г. Зенкевич, К.М. Королев**

*Санкт-Петербургский государственный университет, институт химии  
Российская Федерация, 198504, С-Петербург, Университетский пр. 26  
izenkevich@yandex.com*

Поступила в редакцию 1 сентября 2014 г.,  
после исправления – 23 октября 2014 г.

Одним из методов количественного хроматографического определения аналитов в сложных матрицах, обладающих сорбционными свойствами, является модифицированный метод двойного внутреннего стандарта. Он основан на введении известных количеств двух гомологов определяемых соединений непосредственно в исходные образцы. Такой способ обеспечивает высокую точность определений вне зависимости от потерь компонентов на всех стадиях подготовки проб.

Возможности метода продемонстрированы на модельных образцах, получаемых нанесением полярных алканкарбоновых кислот на полярный сорбент Силипор 75 с их последующим экстрагированием и превращением в производные (этиловые эфиры) для газохроматографического анализа. Относительные погрешности определений составляют (-1)-(-8) %, что существенно меньше, чем другими методами. Показано, что этот способ применим в случаях присутствия гомологов определяемых аналитов в исходных образцах и может быть распространен на любое число атомов углерода в молекулах таких стандартов.

Единственным существенным ограничением метода двойного внутреннего стандарта является доступность образцов сравнения целевых аналитов.

**Ключевые слова:** Количественный хроматографический анализ, эффекты матриц, подготовка проб, потери аналитов, десорбция, экстрагирование, получение производных (дериватизация), метод двойного внутреннего стандарта.

**Зенкевич Игорь Георгиевич** – д.х.н., профессор кафедры органической химии института химии СПбГУ.

**Область научных интересов:** хроматографические методы анализа, идентификация неизвестных веществ.

**Автор/соавтор более 550 публикаций.**

**Королев Константин Михайлович** – выпускник лаборатории газовой хроматографии кафедры органической химии химического факультета СПбГУ.

**Область научных интересов:** органический анализ, химия наноразмерных частиц.  
**Соавтор пяти публикаций и двух патентов.**

### Введение

Большинство методов количественного хроматографического анализа (внешнего стандарта, абсолютной градуировки, внутреннего стандарта и внутренней нормализации) предполагают определение целевых аналитов не в исходных образцах, а в подготовленных пробах [1-3]. Достижение необходимой точности определений требует достаточно высоких степеней извлечения аналитов из образцов, что трудно обеспечить, если их матрицы обладают сорбционными свойствами или неудовлетворительными реологическими характеристиками. Метод стандартной добавки (СД) позиционирован для применения именно в подобных сложных случаях [4-6]. Однако, как показала про-

верка его возможностей на примере специально приготовленных образцов (гидрофобные аналиты в гидрофобных матрицах в присутствии гидрофобных сорбентов или, *vice versa*, гидрофильные аналиты в гидрофильных матрицах в смесях с гидрофильными сорбентами) [7], достижение необходимой точности определений часто предполагает дополнительные модификации метода. К ним относится, во-первых, использование нескольких (последовательных или параллельных) стандартных добавок с последующей экстраполяцией результатов на их «нулевые» или «бесконечно большие» значения [8-10]. Другой прием – искусственное превращение образцов сложного состава в гетерофазные системы с последующим анализом фаз, содержащих меньшие количества мешающих ком-

понентов. В хромато-масс-спектрометрии известен такой способ, как изотопное разбавление, предполагающий введение изотопно-меченых аналогов целевых аналитов в анализируемые образцы. Однако все перечисленные способы количественного анализа требуют либо дополнительных экспериментальных операций (и, следовательно, соответствующих затрат времени), либо поиск (или синтез) труднодоступных образцов сравнения.

Сравнительная характеристика методов количественного хроматографического анализа по таким критериям их применимости к образцам со сложными матрицами как необходимость использования дополнительного оборудования, вспомогательных операций подготовки проб или градуировки, возможность определения содержания аналита в образцах вне зависимости от их объема ( $m_x$ ), эффективность компенсации неполноты извлечения аналитов из матриц и оценка затрат времени приведена в табл. 1.

Поиск оптимальных способов количественного анализа подобных образцов заставляет продолжить рассмотрение возможностей метода двойного внутреннего стандарта (**ДВС**), точнее – его

модифицированного в работах [11, 12] варианта. В обычном методе внутреннего стандарта (**ВС**) в подготовленные к анализу пробы вводят известное количество стандарта ( $m_{ст}$  или  $c_{ст}$ ):

$$m_x \text{ или } c_x = (m_{ст} \text{ или } c_{ст}) k_{x/ст} S_x / S_{ст}, \quad (1)$$

$$\delta(m_x \text{ или } c_x) \approx [\delta(k_{x/ст})^2 + \delta(S_x / S_{ст})^2]^{1/2}, \quad (2)$$

где  $k_{x/ст}$  – предварительно определенный коэффициент чувствительности детектора к определяемому соединению относительно стандарта;  $S_x$  и  $S_{ст}$  – площади соответствующих пиков;  $\delta$  – символ относительной погрешности;  $\delta x = \Delta x / \langle x \rangle$ , %.

Вариант двойного стандарта предложен М.С. Вигдергаузом в 1986 г. [13]. Он предполагает вычисление средних геометрических значений ( $m_x$  или  $c_x$ ) по двум различным компонентам, но не предусматривает никаких специальных условий их выбора. Для упрощения записи здесь и далее формулы представлены для суммарных количеств аналитов в образцах ( $m_x$ ), а не их концентраций ( $c_x$ ):

$$m_x = S_x [(m_{ст(1)} k_{x/ст(1)} / S_{ст(1)}) (m_{ст(2)} k_{x/ст(2)} / S_{ст(2)})]^{1/2}. \quad (3)$$

**Таблица 1**

Сравнительная характеристика методов количественного хроматографического анализа по критериям их применимости к образцам со сложными матрицами

Метод анализа	Необходимость использования специального оборудования	Необходимость дополнительных операций (приготовление дополнительных проб, градуировка) или образцов	Возможность определения суммарного содержания аналита в исходном образце без учета его объема	Компенсация неполноты извлечения аналитов из исходных образцов	Затраты времени
Внешнего стандарта	нет	есть	нет	нет	низкие
Абсолютной градуировки	нет	есть	нет	нет	высокие
Внутреннего стандарта	нет	есть	нет	нет	низкие
Изотопного разбавления (в хромато-масс-спектрометрии)	есть	есть	<b>есть</b>	<b>есть</b>	низкие
Внутренней нормализации	нет	<b>нет</b>	нет	нет	низкие
Стандартной добавки	нет	<b>нет</b>	<b>есть</b>	±*	низкие
Последовательных стандартных добавок	нет	есть	<b>есть</b>	<b>есть</b>	высокие
Стандартных добавок в гетерофазные системы	нет	есть	<b>есть</b>	<b>есть</b>	средние
Двойного внутреннего стандарта	нет	<b>нет</b>	<b>есть</b>	<b>есть</b>	средние**

Примечания: \*) В зависимости от сложности и свойств матриц анализируемых образцов; \*\*) без учета затрат времени на поиск необходимых стандартов-гомологов.

Такой подход был рекомендован для исключения случайных выбросов (промахов) результатов определений вследствие, например, ошибок при взятии навесок. Однако многолетний опыт одного из авторов (И.З.) обучения студентов показывает, что подобные погрешности, в отличие от других, встречаются исключительно редко. В результате, такой вариант метода ДВС не получил распространения, так как приводит к нерациональному увеличению затрат времени из-за необходимости предварительного определения двух коэффициентов относительной чувствительности  $k_{x/ст}$  и возрастанию случайной составляющей погрешности определений как за счет двух значений  $k_{x/ст}$ , так и двух отношений ( $S_x / S_{ст}$ ) вместо одного.

Однако позже было установлено [11, 12], что специальный выбор двух внутренних стандартов превращает метод ДВС в один из наиболее точных способов определения содержания целевых аналитов в любых матрицах при использовании различных способов подготовки проб и, следовательно, при любых уровнях потерь определяемых соединений на этой стадии. Это возможно, если выбираемые внутренние стандарты представляют собой не произвольные соединения, а предыдущий и последующий гомологи определяемых аналитов. Другими словами, если число атомов углерода в молекуле целевого аналита равно  $n$ , то в стандартах оно должно быть  $(n - 1)$  и  $(n + 1)$ . Известно, что практически любые свойства гомологов ( $A$ ) подчиняются рекуррентным соотношениям первого порядка:  $A(n + 1) = aA(n) + b$  [11, 12, 14]. Отсюда следует возможность их интерполяции средними геометрическими значениями,  $A(n) \approx [A(n - 1)A(n + 1)]^{1/2}$ , лежащая в основе метода ДВС (урав. 3). При таком выборе стандартов нет необходимости предварительного определения коэффициентов  $k_{x/ст}$  (их гомологические вариации взаимно компенсируются), так что формула (3) трансформируется в более простое соотношение:

$$m_x = S_x [(m_{ст(1)} / S_{ст(1)}) (m_{ст(2)} / S_{ст(2)})]^{1/2}. \quad (4)$$

Показано, что модифицированный метод ДВС обеспечивает высокую точность определений при использовании таких операций подготовки проб, как жидкостная и газовая (парофазный анализ) экстракция, перегонка (концентрирование в конденсатах паров) и отгонка растворителя (концентрирование в кубовых остатках) [11, 12]. Однако проверенные варианты не исчерпывают все многообразие различных способов и вариантов подготовки проб. Настоящая работа посвящена распространению возможностей модифицированного варианта ДВС для определения полярных аналитов в пробах, матрицы которых обладают сорбционными свойствами, в сочетании с дополнительным получением их производных (дериватизация). Кроме того, рассмотрены некоторые важные аспекты самих анализов, в том числе особенности их выполнения в

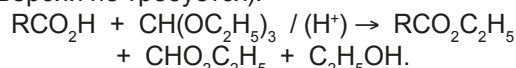
случае возможного присутствия гомологов определяемых аналитов в образцах и при использовании любых гомологов (не обязательно соседних) в качестве внутренних стандартов.

## Экспериментальная часть

**Приготовление образцов и подготовка проб.** В качестве модельных использовали образцы, получаемые нанесением алканкарбоновых кислот  $C_{12}$  (лауриновая),  $C_{13}$  (тридекановая),  $C_{14}$  (миристиновая),  $C_{15}$  (пентадекановая) и  $C_{16}$  (пальмитиновая) на полярный сорбент Силипор 75 (LaChema, ЧСФР, фракция 0.16-0.20 мм). Нанесение проводили из растворов в  $CHCl_3$ , массовая доля кислот 1-3 %. Добавление внутренних стандартов к таким образцам проводили из их растворов в  $CHCl_3$  (2 мл раствора на 1 г образца), совмещая со стадией экстракции аналитов. Для повышения интенсивности массообмена и обеспечения необходимой степени десорбции полярных аналитов с полярного сорбента были проверены следующие способы (по отдельности и в сочетаниях) дополнительной обработки проб:

- продолжительное экстрагирование (не менее 12 часов);
- добавка полярных компонентов (вытеснителей), сорбирующихся лучше, чем аналиты (применяли избыток глицерина, содержащего три гидроксильных группы в молекуле). При использовании хроматографической колонки с полярной неподвижной фазой OV-225 пики глицерина не регистрируются;
- обработка ультразвуком (ультразвуковая ванна УЗВ-1,3; 35 кГц; 60 мин при температуре 40 °С).

Экстракты отделяли от матриц декантацией (полное извлечение не требуется), концентрировали путем отгонки растворителя на водяной бане до объема 200-300 мкл (точное определение объема кубового остатка не требуется) и непосредственно перед анализом переводили кислоты в их этиловые эфиры обработкой 0.3 мл ортомуравьиного эфира ( $n_D^{20} = 1.388$ , справочное значение – 1.391), содержащего около 7 % примесей этанола и этилформиата (хроматографический контроль) в присутствии каталитических количеств серной кислоты при 100 °С в течение 1 мин (определение степени конверсии не требуется):



Такой реагент ранее не использовали для получения производных органических кислот [15]. Для подтверждения индивидуальности исходных карбоновых кислот и образования этиловых эфиров определяли индексы удерживания ( $R/I$ ) продуктов реакции на WCOT-колонке со стандартной неполярной полидиметилсилоксановой неподвижной фазой OV-101 (табл. 2):

Часть предварительных экспериментов проведена с образцом миристиновой кислоты, содержание основного компонента в котором составля-

**Таблица 2**

Экспериментальные и справочные значения индексов удерживания этиловых эфиров алканкарбоновых кислот  $C_{12} - C_{16}$

Этиловый эфир	$R/I_{\text{эксп}}$	$R/I_{\text{справ}}$ [16]
$C_{11}H_{23}CO_2C_2H_5$	$1575 \pm 2$	$1579 \pm 4$
$C_{12}H_{25}CO_2C_2H_5$	$1676 \pm 3$	$1677 \pm 5$
$C_{13}H_{27}CO_2C_2H_5$	$1774 \pm 4$	$1778 \pm 5$
$C_{14}H_{29}CO_2C_2H_5$	$1877 \pm 4$	$1880 \pm 4$
$C_{15}H_{31}CO_2C_2H_5$	$1979 \pm 3$	$1979 \pm 5$

ло ~80 % (остальное – не детектируемые примеси), что учитывали введением соответствующего поправочного коэффициента.

**Условия газохроматографического анализа.** Анализ проб проводили:

1. На газовом хроматографе Цвет-500М с пламенно-ионизационным детектором и стеклянной насадочной колонкой длиной 2 м и внутренним диаметром 3 мм с 5 % полярной фазы OV-225 на Хроматоне N Супер (фракция 0.25-0.315 мм) в различных режимах программирования температуры от 60-100 до 200-250 °С со скоростью 4-6 °С/мин. Газ-носитель азот, объемная скорость 25 мл/мин. Обработку данных проводили с использованием ПО «МультиХром» (Амперсенд, Москва, версия 15). Для дозирования проб использовали шприц МШ-10, объем проб 1 мкл.

2. На газовом хроматографе Биохром-1 с пламенно-ионизационным детектором и WCOT колонкой из плавленного кварца длиной 25 м, внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки стандартной неполярной фазы OV-101 0.25 мкм в режимах

программирования температуры от 60-100 до 220 °С со скоростью 6 °С/мин. Газ-носитель азот, линейная скорость 24 см/с. Деление потока при вводе проб 1 : 30, объем проб 0.4-0.6 мкл. Для измерения параметров хроматографических сигналов использовали интегратор TR-2213 (Япония). Для определения индексов удерживания использовали смесь *n*-алканов  $C_{10} - C_{20}$  с четным числом атомов углерода в молекулах.

Необходимые для расчетов площади пиков вычисляли усреднением результатов трех параллельных определений.

## Результаты и их обсуждение

Для количественного определения содержания алканкарбоновых кислот в модельных образцах необходима десорбция целевых аналитов (содержат активные атомы водорода в составе карбоксильных групп) с поверхности полярного сорбента (Силипор 75), их экстрагирование выбранным растворителем (хлороформ) и получение производных для газохроматографического анализа (этиловые эфиры). На каждой из перечисленных стадий возможны потери аналитов и внутренних стандартов. Поскольку устранение таких потерь невозможно, для получения приемлемых по точности результатов необходима их компенсация. По этой причине небезынтересно сравнить принципы компенсации потерь аналитов в разных методах количественного анализа, сопоставленные в табл. 3.

Метод изотопного разбавления (упомянут для сравнения) основан на идентичности всех физико-химических свойств аналитов и их изотопно-меченых аналогов. Метод стандартной добавки предполагает близкие уровни потерь определяе-

**Таблица 3**

Принципы учета потерь аналитов в различных методах количественного хроматографического анализа

Метод анализа	Принцип компенсации потерь аналитов на разных стадиях подготовки проб	Экспериментальные операции
Стандартной добавки	Близкие уровни потерь аналитов до и после добавки на разных стадиях подготовки проб	Введение добавок не в подготовленные пробы, а в исходные образцы
Последовательных стандартных добавок	Математический учет искажений состава подготовленных проб (экстраполяция)	Последовательное или параллельное введение нескольких добавок в исходные образцы
Стандартных добавок в гетерофазные системы	Контроль максимально близкого распределения аналитов между фазами до и после добавок	Превращение исходных образцов в гетерофазные системы
<b>Двойного внутреннего стандарта</b>	Учет гомологических вариаций свойств аналитов и стандартов	Введение двух внутренних стандартов (гомологов аналитов) в исходные образцы
Изотопного разбавления (для сравнения)	Идентичные физико-химические свойства исходных аналитов и их изотопно-меченых аналогов; одновременная регистрация их сигналов в суммарных масс-спектрах.	Введение изотопно-меченых аналогов целевых аналитов в исходные образцы

мых соединений на всех стадиях подготовки проб до и после добавок. Возможное влияние мешающих компонентов матриц может быть скомпенсировано модификацией этого метода для гетерофазных систем. В общем же случае это предположение требует контроля, что достигается в варианте последовательных стандартных добавок. Он предполагает математическую обработку результатов определений, а именно их экстраполяцию на гипотетические нулевые или бесконечно большие добавки. И, наконец, модифицированный метод ДВС принципиально отличен от всех остальных, так как в его основе лежат идентичные вариации различных свойств гомологов в пределах рядов [14]. Следовательно, при выборе именно таких внутренних стандартов, какими бы причинами ни были вызваны потери компонентов проб, они всегда могут быть скомпенсированы.

Интересно заметить, что во многих руководствах декларированы определенные требования к выбору внутренних стандартов (см., например, [2]), основными из которых являются их инертность к компонентам образцов, способность с ними смешиваться, полное разделение с определяемыми соединениями и, в то же время, не слишком большие различия параметров удерживания, а также условие  $k_{x/ст} \approx 1$ , что возможно в том случае, если аналиты и стандарты относятся к одному классу соединений. Несложно заметить, что всем этим требованиям однозначно удовлетворяют гомологи определяемых соединений, которые при  $\Delta l_c = 1$  как в газовой хроматографии, так и в обращенно-фазовой ВЭЖХ по определению отличаются от целевых аналитов на  $\pm 100$  ед. индекса. При таких различиях индексов удерживания хроматографическое разделение не требует предварительного контроля и достигается не только на капиллярных, но и на насадочных колонках.

Первый этап характеристики новых возможностей метода ДВС включает проверку простейшего варианта, когда анализируемые образцы не

содержат мешающих компонентов, а именно гомологов определяемых соединений. В табл. 4 приведена расшифровка экспериментальных деталей некоторых результатов определения содержания алканкарбоновых кислот  $C_{14}H_{29}CO_2H$  и  $C_{13}H_{27}CO_2H$  в модельных образцах. Установлено, что для повышения интенсивности массообмена в системе «сорбент-экстрагент» и, следовательно, достижения необходимой степени десорбции полярных аналитов с полярного сорбента, подготовка проб во всех случаях не может ограничиваться даже длительным экстрагированием и должна включать добавление вытеснителей (использовали полярный глицерин) и обработку образцов ультразвуком. При выполнении этих условий модифицированный метод ДВС обеспечивает точность результатов по критерию «введено-найдено» на уровне  $-(1-7)\%$  отн. Примечательно, что все отклонения имеют один и тот же знак «минус», что свидетельствует о систематическом характере погрешностей, который в данном случае объясним. Предварительно нанесенные на полярный сорбент кислоты оказываются более полно сорбированными, чем стандарты, вводимые вместе с растворителем-экстрагентом, когда времени для достижения равновесия не достаточно. Устранение таких погрешностей возможно в результате дальнейшего «ужесточения» условий подготовки проб, например, повышения температуры на стадии их ультразвуковой обработки.

Тем не менее, такая точность определений значительно выше, чем достигаемая в обычном методе внутреннего стандарта. Например, при вычислениях только по одному стандарту 1 (в предположении  $k_{x/ст} \approx 1$ ) относительные погрешности первых трех результатов составляют  $-(18-25)\%$ , а вторых трех –  $-(38-45)\%$  отн., что неприемлемо. При расчетах только по стандарту 2 результаты закономерно оказываются существенно завышенными.

Первые три примера в табл. 4 соответствуют выбору «соседних» гомологов, отличающихся от целевого аналита на один атом углерода в мо-

**Таблица 4**

Некоторые результаты количественного определения содержания алканкарбоновых кислот в модельных образцах (с предварительным получением их этиловых эфиров) модифицированным методом двойного внутреннего стандарта (вычисления по уравнению 4)

Определяемый компонент (x)/стандарты	Массы компонентов, мг			Площади пиков компонентов, мВ·мс·10 <sup>-5</sup>			Результаты анализа	
	$m_x$	$m_{ст(1)}$	$m_{ст(2)}$	$S_x$	$S_{ст(1)}$	$S_{ст(2)}$	Найдено, $m_x$ , мг	Отн. погрешность, %
$C_{14}H_{29}CO_2H/C_{13}H_{27}CO_2H + C_{15}H_{31}CO_2H$	2.37	1.45	2.86	7.29	5.97	6.89	2.31	-2.5
То же	2.37	2.33	2.15	7.48	8.99	5.66	2.35	-0.8
То же	2.37	2.71	1.19	7.55	10.74	3.31	2.27	-4.2
$C_{13}H_{27}CO_2H/C_{11}H_{23}CO_2H + C_{15}H_{31}CO_2H$	1.05	1.43	1.57	3.61	8.51	3.56	0.98	-6.7
То же	1.05	2.31	1.02	3.59	12.74	2.48	0.99	-5.7
То же	1.05	0.95	2.75	3.58	5.90	5.82	0.99	-5.7

лекуле. Вторые три примера характеризуют выбор гомологов, отличающихся на два атома углерода. Обработка результатов в обоих случаях идентична.

Особенностью многих реальных образцов является присутствие в них гомологов определяемых аналитов, которые, естественно, перекрываются с вводимыми стандартами. Однако это не является существенным ограничением метода; расчетная формула (4) в этом случае должна быть модифицирована по аналогии с расчетной формулой метода стандартной добавки:

$$m_x = S_x \{ [m_{ст(1)} / (S_{ст(1)} - S_{ст(1)}^0)] [m_{ст(2)} / (S_{ст(2)} - S_{ст(2)}^0)] \}^{1/2}, \quad (5)$$

где  $S_{ст}^0$  – площадь пика стандарта, присутствующего в образце до добавки,  $S_{ст}$  – площадь соответствующего пика после добавки.

Такой вариант метода ДВС представляется настолько «естественным» и простым, что даже не заслуживает специальной иллюстрации в виде таблицы результатов, аналогичной табл. 4. Достаточно отметить, что относительные погрешности определений в этом случае закономерно несколько увеличиваются до (-3)-(-9) % из-за необходимости измерения пяти значений площадей пиков вместо трех при использовании формулы (4).

Выбор в качестве внутренних стандартов двух «соседних» гомологов определяемых соединений с числом атомов углерода  $(n - 1)$  и  $(n + 1)$  представляется одним из ограничений модифицированного метода ДВС, которое желательно было бы устранить. Соотношение (4) можно записать в виде  $m_{x(n)}^2 = m_{x(n-1)} m_{x(n+1)}$ , где символы  $m_x$  обозначают количества аналитов с числом атомов углерода в молекулах  $n$ ,  $(n - 1)$  и  $(n + 1)$ , соответственно. Аналогично, для  $m_{x(n+1)}$  справедливо аналогичное соотношение  $m_{x(n+1)}^2 = m_{x(n)} m_{x(n+2)}$ . Объединение этих двух уравнений дает  $m_{x(n)}^3 = m_{x(n-1)}^2 m_{x(n+2)}$ , а его обобщение на гомологи с любым числом атомов углерода имеет вид  $m_{x(n)} = [m_{x(n-1)}^i m_{x(n+1)}^{k-1}]^{1/(i+k)}$ . Используя

символику уравнения (4), получаем соотношение для модифицированного метода ДВС для любых гомологов с числом атомов углерода в молекуле  $(n - k)$  и  $(n + i)$ :

$$m_x = S_x \{ [(m_{ст(n-k)} / S_{ст(n-k)})] [(m_{ст(n+i)} / S_{ст(n+i)})] \}^{1/(i+k)}, \quad (6)$$

В реальной аналитической практике значения  $i$  и  $k$  вряд ли будут превышать 2-3. Интересным следствием формулы (6) является то, что при  $i = k$  во всех случаях справедливо простейшее соотношение (4), что и использовано при обработке данных, представленных в табл. 4. Кроме того, соотношение (6) математически корректно подтверждает тот интуитивно ожидаемый факт, что из двух внутренних стандартов на результаты определения  $m_x$  большее влияние оказывает тот, сигнал которого на хроматограмме расположен «ближе» к сигналу целевого аналита.

Результаты применения соотношения (6) для определения содержания тех же алканкарбоновых кислот в модельных образцах проиллюстрированы данными, приведенными в табл. 5 для случаев  $k = 1, i = 2$  и  $k = 2, i = 1$ . Относительные погрешности определений в этих примерах составляют (-4-8) %, то есть существенно не отличаются от аналогичных характеристик других примеров.

Таким образом, уникальные возможности модифицированного метода двойного внутреннего стандарта позволяют применять его при использовании таких операций подготовки проб, как десорбция аналитов органическим растворителем с сорбента в сочетании с получением их производных для газохроматографического анализа. Суть этого метода заключается в выборе в качестве стандартов гомологов определяемых соединений. Показано, что его особенности, связанные с возможностью присутствия выбранных гомологов в анализируемых образцах и с ограничениями на число атомов углерода в их молекулах вполне преодолимы. Наи-

Таблица 5

Некоторые результаты количественного определения содержания алканкарбоновых кислот в модельных образцах (с предварительным получением их этиловых эфиров) модифицированным методом двойного внутреннего стандарта при выборе различных гомологов в качестве стандартов (вычисления по уравнению 6)

Соотношение $k$ и $i$ в формуле (6)	Определяемый компонент (x)/стандарты	Массы компонентов, мг			Площади пиков компонентов, мВ·мс·10 <sup>-5</sup>			Результаты анализа	
		$m_x$	$m_{ст(1)}$	$m_{ст(2)}$	$S_x$	$S_{ст(1)}$	$S_{ст(2)}$	Найдено, $m_x$ , мг	Отн. погрешность, %
$k = 1,$ $i = 2$	$C_{12}H_{29}CO_2H /$ $C_{11}H_{27}CO_2H + C_{14}H_{31}CO_2H$	1.86	1.51	2.24	5.58	5.89	4.55	1.78	-4.3
	То же	1.86	3.08	1.19	5.49	12.68	2.31	1.71	-8.1
$k = 2,$ $i = 1$	$C_{13}H_{27}CO_2H /$ $C_{11}H_{23}CO_2H + C_{14}H_{31}CO_2H$	2.17	1.93	2.69	5.49	8.06	5.66	2.08	-4.1
	То же	2.17	1.82	1.44	5.55	7.91	3.19	2.00	-7.8

более существенным представляется относительно редко принимаемое во внимание ограничение, а именно практическая доступность образцов сравнения гомологов целевых аналитов.

Характеристика предлагаемого варианта количественного анализа на модельных образцах (по аналогии с работой [14]) является необходимой стадией его проверки. После этого он может быть распространен на реальные объекты с аналогичными по свойствам матрицами, требующие превращения определяемых аналитов в различные производные.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Новак Й. Количественный анализ методом газовой хроматографии: Пер. с англ. М.: Мир, 1978. 175 с.
2. Практическая газовая и жидкостная хроматография / Б.В. Столяров [и др.]. СПб: Изд. СПбГУ, 2002. 610 с.
3. Grob R.L., Barry E.F. Modern Practice of Gas Chromatography. 4<sup>th</sup> Edn. New York: John Wiley & Sons, 2004. 1045 p.
4. Зенкевич И.Г., Рагозина Т.Н. Количественный газохроматографический анализ компонентов гетерофазных систем методом двойной стандартной добавки // Журн. прикладн. химии. 1998. Т. 71, № 5. С. 763-767.
5. Зенкевич И.Г., Остроухова О.К. Сравнение методов внешнего стандарта и стандартной добавки для количественного хроматографического определения содержания пестицидов в растительных объектах // Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61, № 5. С. 481-491.
6. Зенкевич И.Г., Климова И.О. Применение метода стандартной добавки для количественного газохроматографического анализа // Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61, № 10. С. 1048-1054.
7. Зенкевич И.Г., Морозова Т.Е. Области применения и особенности количественного хроматографического анализа методом последовательных стандартных добавок // Журн. аналит. химии. 2014. Т. 69, № 4. С. 369-377.
8. Зенкевич И.Г., Морозова Т.Е. Особенности ВЭЖХ-МС определения моноэтаноламина в водных растворах методом стандартной добавки // Аналитика и контроль. 2012. Т. 16, № 2. С. 181-187.
9. Мариничев А.Н., Морозова Т.Е., Зенкевич И.Г. Применение логистической регрессии при количественном анализе методом последовательных стандартных добавок // Успехи совр. естествозн. 2013. № 11. С. 152-157.
10. 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) / Т.Е. Морозова [и др.] // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17, № 2. С. 184-189.
11. Zenkevich I.G., Makarov E.D. Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation. Application of the modified method of double internal standard // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1150. P. 117-123.
12. Зенкевич И.Г., Макаров Е.Д., Макарова И.Ю. Количественный хроматографический анализ при изменении состава образцов в ходе подготовки проб. Модификация метода двойного внутреннего стандарта // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62, № 8. С. 829-838.
13. Вигдергауз М.С., Краузе И.М. Развитие методов количественной интерпретации хроматограмм сложных смесей // Журн. аналит. химии. 1986. Т. 41, № 11. С. 2064-2074.
14. Зенкевич И.Г. Общие закономерности изменения физико-химических свойств органических соединений в гомологических рядах // Журн. органич. химии. 2006. Т. 42. Вып. 1. С. 9-20.
15. Blau K., Halket J.M. Handbook of Derivatives for Chromatography. 2<sup>nd</sup> Edn. New York: John Wiley & Sons, 1993. 369 p.
16. The NIST 11 Mass Spectral Library (NIST11/2011/EPA/NIH). Software/Data Version (NIST08); NIST Standard Reference Database, Number 69, August 2011. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899. [Электронный ресурс]: <http://webbook.nist.gov> (дата обращения: 31.08.2014).

## NEW APPLICATIONS OF THE DOUBLE INTERNAL STANDARD METHOD IN CHROMATOGRAPHIC QUANTITATION

*Igor G. Zenkevich, Konstantin M. Korolev*

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

One of the methods of chromatographic quantitation of analytes in complex matrices with sorption properties is the modified double standard method. It implies introducing the two homologues of target analytes into original samples. This mode provides high accuracy of determinations despite any losses of their constituents at all stages of the sample preparation.

The application of this method is illustrated on the examples of model samples prepared by adding of polar alkanecarboxylic acids to the polar sorbent Silipor 75 (LaChema, Check Republic) followed by their extraction and conversion into derivatives (ethyl esters) for gas chromatographic determination. Relative errors of this mode are (-1) – (-8) %, that is significantly less than those of other possible methods. It is shown that this method is applicable if there is a presence of homologues of analytes in the initial samples, and it can be generalized for any number of carbon atoms in the molecules of the selected standards.

The single principal restriction of the double internal standard method remains to be practical availability of the reference samples of homologues.

**Key words:** Quantitative chromatographic analysis, matrix effects, sample preparation, losses of analytes, desorption, extraction, derivatization, double internal standard method.

## REFERENCES

1. Novak J. *Quantitative Analysis by Gas Chromatography*. New York: Marcel Dekker Inc., 1975. 130 p.
2. Stolyarov B.V., Savinov I.M., Vitenberg A.G., Kartsova L.A., Zenkevich I.G., Kalmanovskii V.I., Kalambet Yu.A. *Prakticheskaia gazovaia i zhidkostnaia khromatografiia* [Practical Gas and Liquid Chromatography]. St. Petersburg, Univ. Press, 2002. 610 p. (in Russian).
3. Grob R.L., Barry E.F. *Modern Practice of Gas Chromatography*. 4<sup>th</sup> Edn. New York: John Wiley & Sons, 2004. 1045 p.
4. Zenkevich I.G., Ragozina T.N. [Quantitative gas chromatographic analysis of heterophase systems constituents by double standard addition]. *Zhurnal prikladnoi khimii* [Rus. J. Appl. Chem.], 1998, vol. 71, no. 5, pp. 763-767.
5. Zenkevich I.G., Ostroukhova O.K. [A comparison of the external standard and standard addition methods for the quantitative chromatographic determination of pesticide concentrations in plant samples]. *Zhurnal analiticheskoi khimii* [Rus. J. Anal. Chem.], 2006, vol. 61, no. 5, pp. 442-451.
6. Zenkevich I.G., Klimova I.O. [Use of the Standard Addition Method in Quantitative Chromatographic Analysis]. *Zhurnal analiticheskoi khimii* [Rus. J. Anal. Chem.], 2006, vol. 61, no. 10, pp. 967-972.
7. Zenkevich I.G., Morozova T.E. [Areas of application and characteristics of quantitative chemical analysis by the consecutive standard addition method]. *Zhurnal analiticheskoi khimii* [Rus. J. Anal. Chem.], 2014, vol. 69, no. 4, pp. 327-335.
8. Zenkevich I.G., Morozova T.E. [Features of HPLC-MS determination of monoethanolamine in aqueous solutions by standard addition]. *Analitika i Kontrol'* [Analytcs and Control], 2012, vol. 16, no. 2, pp. 181-187 (in Russian).
9. Marinichev A.N., Morozova T.E., Zenkevich I.G. [Application of the logistic regression for quantitation by standard addition]. *Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniia* [Success of modern natural science], 2013, no. 11, pp. 152-157 (in Russian).
10. Morozova T.E., Karakashev G.V., Sorokoumov P.N., Savel'eva E.I., Zenkevich I.G. [Comparison of the precision of calibration and modified standard addition methods on the example of determination of 3-(2,2,2-trimethylhydrazine)propanoic acid in urine at non-linear detection]. *Analitika i Kontrol'* [Analytcs and Control], 2013, vol. 17, no. 2, pp. 184-189 (in Russian).
11. Zenkevich I.G., Makarov E.D. [Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation. Application of the modified method of double internal standard]. *J. Chromatogr. A.*, 2007, V. 1150, pp. 117-123. doi: 10.1016/j.chroma.2006.08.083
12. Zenkevich I.G., Makarov E.D., Makarova I.Yu. [Quantitative chromatographic analysis at the variation of sample composition during sample preparation. Modification of the double internal standard method]. *Zhurnal analiticheskoi khimii*. [Rus. J. Anal. Chem.], 2007, vol. 62, no. 8, pp. 748-755.
13. Vigdergauz M.S., Krause I.M. [Development of methods for quantitative interpretation of chromatograms of complex mixtures]. *Zhurnal analiticheskoi khimii*. [Rus. J. Anal. Chem.], 1986, vol. 41, no. 11, pp. 2064-2074.
14. Zenkevich I.G. [General relations holding in variations of physical properties of organic compounds within homologous series]. *Zhurnal organicheskoi khimii*. [Rus. J. Org. Chem.], 2006, vol. 42, no. 1, pp. 1-11.
15. Blau K., Halket J.M. *Handbook of Derivatives for Chromatography*. 2<sup>nd</sup> Edn. New York: John Wiley & Sons, 1993. 369 p.
16. The NIST 11 Mass Spectral Library (NIST11/2011/EPA/NIH). Software/Data Version (NIST08); NIST Standard Reference Database, Number 69, August 2011. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899. Available at: <http://webbook.nist.gov> (Accessed August 31, 2014).