

УДК 54.061

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СТАНДАРТНОГО ОТКЛОНЕНИЯ ВРЕМЕНИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО УДЕРЖИВАНИЯ В РЕЖИМЕ ПРОГРАММИРОВАНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ КАПИЛЛЯРНОЙ КОЛОНКИ

© 2021 г. В. И. Абдрахманов^а, С. А. Добротин^б, О. Н. Косырева^{б, *}, В. И. Логотов^{с, **}

^аООО “Ареал Медикал”

ул. Кольская, 1, Москва, 129329 Россия

^бДзержинский филиал Российской академии народного хозяйства и государственной службы при Президенте РФ, факультет управления и экономики

ул. Черняховского, 24, Дзержинск, Нижегородская обл., 606016 Россия

^сДзержинский филиал Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

пер. Жуковского, 2, Дзержинск, Нижегородская обл., 606000 Россия

*e-mail: lelia7@list.ru

**e-mail: chromlab@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2020 г.

После доработки 18.11.2020 г.

Принята к публикации 23.11.2020 г.

При качественном анализе сложных смесей неизвестного состава перспективным направлением повышения надежности идентификации веществ является совместное использование нескольких одновременно определяемых аналитических параметров. Для этой цели используется, например, сочетание хроматографических методов с ИК-Фурье спектроскопией, масс-спектрометрией и другими методами. При решении сложных аналитических задач производственного характера экономически целесообразно применение только хроматографических методов. В этом случае при анализе сложных многокомпонентных смесей с высокой плотностью пиков на хроматограмме прецизионность определения времени удерживания определяет надежность идентификации веществ и результата анализа как при идентификации непосредственно по абсолютному времени удерживания, так и по производным от него относительным параметрам (относительные времена удерживания, индексы удерживания). Мерой прецизионности измерения времени хроматографического удерживания является его стандартное отклонение. Экспериментальные времена хроматографического удерживания получали для случая анализа по следующей схеме: начальная изотерма, программирование температуры, конечная изотерма. Отмечено резкое (на порядок) увеличение численного значения стандартного отклонения на этапе программирования температуры. Получено уравнение регрессии, связывающее точечную оценку стандартного отклонения времени удерживания и температуру колонки. Получена метрологическая характеристика уравнения регрессии в виде функции, позволяющей рассчитать суммарную стандартную неопределенность в оценке стандартного отклонения времени хроматографического удерживания. Полученные результаты можно использовать для уточнения времени и индексов хроматографического удерживания, обеспечивающих достоверную идентификацию веществ.

Ключевые слова: качественный анализ, хроматография, время хроматографического удерживания, прецизионность, стандартное отклонение.

DOI: 10.31857/S0044450221050029

Хроматографический метод контроля состава разнообразных объектов распространен весьма широко. В некоторых областях частота его применения достигает 80% от общего числа методик. Анализируя материалы Питтсбургской конференции по аналитической химии и спектроскопии, Я.И. Яшин показал [1], что хроматография, включая хромато-масс-спектрометрию, лидирует

среди всех методов анализа. К преимуществам хроматографического метода относятся высокая степень разделения при малой продолжительности анализа, наличие серийно выпускаемой аппаратуры, наличие большого количества стандартизованных и аттестованных методик.

Основной проблемой анализа сложных многокомпонентных смесей, насчитывающих десятки,

а то и сотни компонентов, является именно идентификация присутствующих в пробе веществ. Перспективным подходом к задаче повышения надежности идентификации веществ является совместное использование нескольких одновременно определяемых аналитических параметров. Для этой цели используют, например, сочетание хроматографических методов с ИК-Фурье спектроскопией [2], масс-спектрометрией [3] и др. База данных Национального института стандартов и технологии США [4] содержит несколько сотен тысяч единиц масс-спектров соединений, дополненных хроматографическими индексами удерживания [3]. Однако при всех вариантах проведения качественного анализа смесей неизвестного состава с использованием хроматографических методов неизменно в качестве одного из аналитических параметров идентификации компонентов смеси используют время хроматографического удерживания (ВХУ) или производные от него показатели.

При решении сложных аналитических задач производственного характера экономически целесообразно применение только хроматографических методов. Следовательно, при использовании высокоэффективных капиллярных колонок для анализа сложных многокомпонентных смесей с высокой плотностью пиков на хроматограмме, когда различие во временах удерживания соседних пиков может составлять лишь несколько секунд, именно прецизионность определения ВХУ определяет надежность идентификации веществ и в конечном итоге результата анализа.

Для конкретных условий анализа и используемой аппаратуры прецизионность ВХУ определяется стабильностью поддержания газового и температурного режима колонки, а также синхронностью моментов времени ввода пробы и старта записи хроматограммы.

Мерой прецизионности измерения любой величины является ее стандартное отклонение (СО). В подавляющем большинстве хроматографических методик показатели прецизионности нормируются только для таких параметров, как площадь или высота пика, определяющих результаты количественного анализа. Верхняя нормируемая граница допустимого значения относительного стандартного отклонения (ОСО) времени удерживания в изотермическом режиме для аналитических газовых лабораторных хроматографов составляет 1–2% при дозировании пробы вручную и 0.1% при автоматическом дозировании [5, 6]. Для режима программирования температуры колонки такая норма отсутствует. В то же время анализ сложных многокомпонентных смесей реализуется в подавляющем большинстве случаев в режиме программирования температуры. Именно для этого случая актуально оценить уровень преци-

зионности времени удерживания современных газовых хроматографов. Зная оценку величины СО, можно перейти к неопределенности результата измерения [7], а затем к статистически значимому различию времен удерживания ближайших хроматографических пиков и соответственно к надежности идентификации веществ в пробе. Такой подход был бы полезен при реализации методик, в которых на хроматограмме пики расположены с высокой плотностью, например, ГОСТа [8].

Данное исследование – составная часть работы по изучению состава ветеринарного препарата АСД-2Ф, широко применяемого в ветеринарии уже более 60 лет [9, 10]. Авторы работы [11] с использованием метода хромато-масс-спектрометрии и капиллярных колонок различной полярности доказали наличие в препарате около 150 органических веществ, однако известно, что препарат содержит гораздо больше соединений. В соответствии с существующими представлениями [12] о возможном механизме совместного пиролиза белков и жиров животного происхождения в безвоздушной среде при 200–500°C в АСД-2Ф и подобных ему продуктах могут присутствовать самые разные азотсодержащие соединения, в том числе и дипептиды. Сложность задачи увеличивается из-за недоступности большинства индивидуальных веществ, которые могут входить в состав препарата.

На рис. 1 показан фрагмент хроматограммы пробы препарата АСД-2Ф, иллюстрирующий высокую плотность пиков. Над каждым пиком указаны две цифры: первая – порядковый номер пика, вторая – время хроматографического удерживания.

Цель данного исследования – количественная оценка прецизионности времен хроматографического удерживания в режиме программирования температуры хроматографической колонки, полученных внутри одной лаборатории.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выполняли качественный анализ двух искусственных смесей. Одна смесь на основе этилового спирта содержала 27 веществ, входящих в состав ветеринарного препарата АСД-2Ф. Для большего увеличения числа пиков различных веществ на протяженности всей хроматограммы в смесь включали некоторые вещества, не входящие в состав АСД-2Ф, но близкие к ним по химическому строению и доступные для приобретения, а именно уротропин и 6-метилурацил. Вторая смесь на основе гексана содержала двадцать *n*-алканов от гептана до гексакозана. Содержание компонентов в обеих смесях подбирали такое, которое включало бы перегрузку колонки.

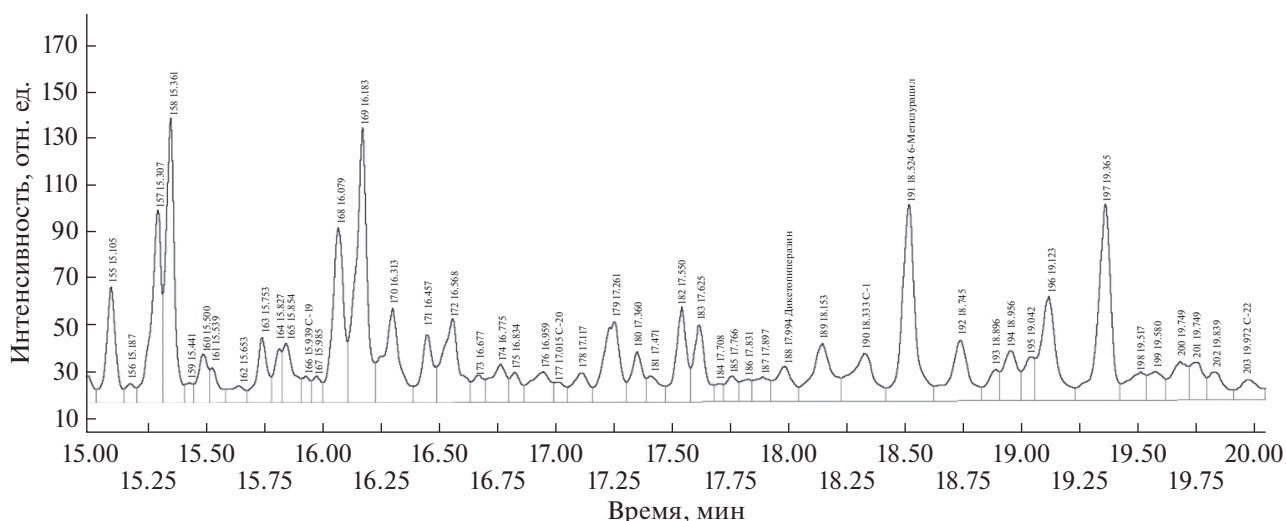


Рис. 1. Фрагмент хроматограммы пробы препарата АСД-2Ф.

Исследования проводили на хроматографе Хроматэк-Кристалл-5000.1. Комплектация хроматографа: испаритель капиллярный, детектор пламенно-ионизационный (ПИД) и капиллярная колонка ВВ-1701 30 м × 0.32 мм × 0.50 μм. Режим работы хроматографа: температура испарителя 250°C, температура ПИД 250°C, начальная температура колонки 120°C, выдержка начальной изотермы 5 мин, скорость подъема температуры колонки 10°C/мин, конечная температура колонки 230°C. В качестве газа-носителя использовали гелий в режиме поддержания постоянного давления перед колонкой 100 кПа, коэффициент деления потока 1/30, режим экономии газа. Газовый режим ПИД: расход водорода 30 мл/мин, расход воздуха 300 мл/мин, поддув инертного газа (гелия) 30 мл/мин. Объем вводимой в испаритель пробы 1 мкл. Пробу вводили вручную. Общая продолжительность – 35 мин.

Время удерживания компонентов определяли в минутах с точностью до четвертого знака после запятой с помощью программного обеспечения, прилагаемого к хроматографу. Использовали программное обеспечение “Хроматэк Аналитик 3.0”.

В условиях повторяемости проводили серию из трех анализов в течение одного рабочего дня с интервалом между анализами 60 ± 1 мин. Всего выполнили десять серий анализов каждой смеси в разные дни с разными промежутками между днями проведения анализа, что соответствует условиям внутрилабораторной прецизионности с изменением фактора “время”. Полученные экспериментальные данные в форме результатов измерений, сбалансированных по рекомендуемым [13] однородным уровням, приведены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Время хроматографического удерживания для каждого компонента, полученное в условиях повторяемости [14], т.е. в одной серии, состоящей из трех анализов, усредняли и находили его выборочное СО. Для каждой серии анализов обнаружена зависимость значения СО от времени, отчетливо проявляющаяся на этапе подъема температуры колонки. Результаты, полученные после усреднения данных по всем сериям, иллюстрирует рис. 2. Оценка СО на участке начальной изотермы составила ~ 0.001 мин, а на участке конечной изотермы – ~ 0.01 мин.

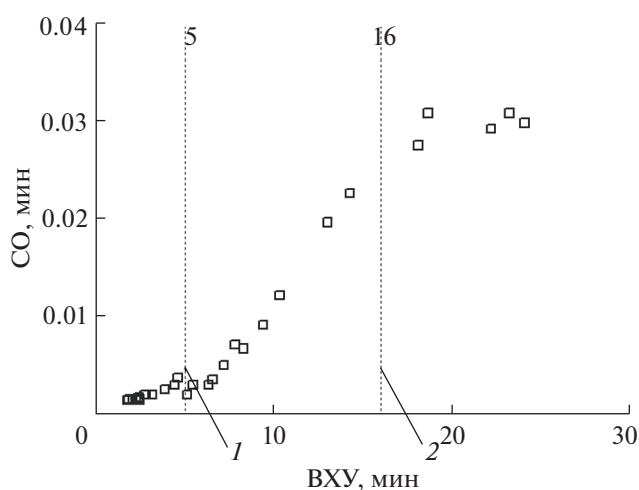


Рис. 2. Зависимость стандартного отклонения от времени анализа: 1 – начало работы в режиме программирования температуры, 2 – конец работы в режиме программирования температуры.

Таблица 1. Результаты (мин) измерений времени хроматографического удерживания

Номер серии измерений	Номер компонента на этапе программирования температуры										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	5.111	5.403	6.269	6.533	7.173	7.771	8.259	9.362	10.282	12.985	14.205
	5.113	5.403	6.272	6.537	7.175	7.772	8.259	9.373	10.295	13.029	14.263
	5.109	5.399	6.267	6.531	7.175	7.769	8.257	9.369	10.294	13.024	14.249
2	5.109	5.397	6.269	6.531	7.177	7.77	8.256	9.361	10.284	13.011	14.239
	5.109	5.398	6.268	6.532	7.175	7.773	8.258	9.369	10.294	13.019	14.252
	5.109	5.399	6.267	6.529	7.171	7.769	8.256	9.369	10.292	13.018	14.252
3	5.107	5.398	6.267	6.529	7.17	7.761	8.248	9.35	10.269	12.977	14.203
	5.107	5.399	6.268	6.533	7.175	7.771	8.255	9.365	10.293	13.016	14.247
	5.106	5.397	6.267	6.533	7.175	7.772	8.261	9.374	10.301	13.028	14.261
4	5.111	5.397	6.266	6.529	7.171	7.765	8.245	9.35	10.267	12.977	14.201
	5.108	5.394	6.261	6.523	7.159	7.757	8.242	9.353	10.274	12.999	14.229
	5.107	5.393	6.26	6.526	7.166	7.76	8.247	9.356	10.281	13.007	14.242
5	5.108	5.395	6.269	6.529	7.171	7.772	8.261	9.371	10.291	13.012	14.239
	5.11	5.399	6.269	6.535	7.179	7.771	8.258	9.372	10.299	13.037	14.273
	5.106	5.397	6.27	6.532	7.178	7.777	8.265	9.379	10.299	13.017	14.245
6	5.109	5.395	6.265	6.53	7.174	7.781	8.261	9.378	10.313	13.051	14.288
	5.111	5.398	6.269	6.53	7.175	7.778	8.257	9.371	10.293	13.018	14.242
	5.111	5.395	6.267	6.532	7.178	7.787	8.261	9.377	10.309	13.05	14.287
7	5.115	5.399	6.265	6.527	7.167	7.77	8.249	9.357	10.278	13.001	14.223
	5.11	5.395	6.269	6.533	7.179	7.787	8.264	9.384	10.312	13.045	14.273
	5.111	5.396	6.267	6.531	7.178	7.784	8.259	9.377	10.308	13.047	14.284
8	5.111	5.393	6.261	6.527	7.169	7.776	8.249	9.366	10.294	13.018	14.246
	5.109	5.394	6.265	6.529	7.173	7.777	8.251	9.365	10.29	13.023	14.248
	5.111	5.394	6.262	6.526	7.169	7.775	8.249	9.365	10.295	13.025	14.252
9	5.112	5.3953	6.2673	6.5287	7.1753	7.78	8.2587	9.3753	10.3053	13.0467	14.2773
	5.1113	5.3967	6.2627	6.523	7.1627	7.7667	8.236	9.3487	10.272	12.998	14.232
	5.1127	5.394	6.2693	6.5327	7.1733	7.782	8.258	9.3727	10.2993	13.032	14.2613
10	5.1093	5.3887	6.262	6.5253	7.1667	7.7753	8.2507	9.3693	10.2993	13.028	14.262
	5.11	5.3913	6.2647	6.5253	7.17	7.7773	8.2547	9.3687	10.3013	13.0267	14.2593
	5.1107	5.3913	6.2613	6.5213	7.1627	7.7713	8.246	9.36	10.29	13.0193	14.2467

Выборочное уравнение линейной регрессии на участке программирования температуры, параметрически идентифицируемое по методу наименьших квадратов, имеет вид:

$$\hat{\sigma} = 2.283 \times 10^{-3} \tau - 1.073 \times 10^{-2},$$

где $\hat{\sigma}$ – оценка условного математического ожидания стандартного отклонения времени хроматографического удерживания, мин; τ – текущее время анализа, мин.

Для установления зависимости СО от температуры колонки учитывали, что температура начальной изотермы составляла 120°C, температура конечной изотермы 230°C, подъем температуры осуществлялся линейно со скоростью 10°C/мин.

В результате аналогичная регрессионная зависимость, связывающая температуру колонки и СО времени хроматографического удерживания, имеет вид:

$$\hat{\sigma} = 2.284 \times 10^{-4} t - 2.673 \times 10^{-2},$$

где t – температура колонки, °C.

Основной метрологической характеристикой уравнения регрессии [15] применительно к данной задаче является СО суммарной погрешности (суммарной стандартной неопределенности) однократного измерения выходной величины y , в качестве которой выступает СО времени хроматографического удерживания. Входной величиной x является время хроматографического удерживания.

живания. В дальнейшем приняты следующие обозначения:

$$\begin{cases} x = \tau \\ y = s(x) \end{cases}$$

Значения выходной координаты y рассчитывали по формуле:

$$y_{ij} = \sqrt{\frac{\sum_{\ell=1}^k (x_{ij\ell} - \bar{x}_{ij})^2}{k-1}},$$

где $x_{ij\ell}$ — время хроматографического удерживания j -го компонента в ℓ -ом анализе i -ой серии; \bar{x}_{ij} — среднее время хроматографического удерживания j -го компонента в i -ой серии; k — число анализов в одной серии.

$$\bar{x}_{ij} = \frac{\sum_{\ell=1}^k x_{ij\ell}}{k}.$$

Исходные данные для этого расчета представлены в табл. 1. Полученные значения выходной координаты y представлены в табл. 2.

Применяемые для расчета неопределенности уравнения регрессии формулы зависят от следующих условий: 1) наличие или отсутствие корреляции между погрешностями определения входной величины; 2) наличие или отсутствие равноточности измерений при определении входной величины.

Погрешность определения любой физической величины определяется композицией случайных и систематических погрешностей [16]. В случае прямых измерений в нормальных условиях систематическая погрешность определяется только основной погрешностью средства измерений [17]. Для данного аппаратно-программного хроматографического комплекса возможно задание предела прецизионности определения времени хроматографического удерживания вплоть до 1×10^{-4} мин и менее. При этом минимальное значение СО этого показателя составляет порядка 0.001 мин, т.е. на порядок больше, вследствие чего систематической погрешностью можно пренебречь. Таким образом, для оценки наличия корреляции между погрешностями определения времени хроматографического удерживания достаточно оценить корреляцию между СО времен хроматографического удерживания отдельных компонентов.

По набору данных, представленных в табл. 2, столбцы которой интерпретировали как значения случайных величин, коэффициенты корреляции рассчитывали по формуле:

$$r_{uv} = \frac{\sum_{i=1}^m (y_{iu} - \bar{y}_u)(y_{iv} - \bar{y}_v)}{\sqrt{\sum_{i=1}^m (y_{iu} - \bar{y}_u)^2 \sum_{i=1}^m (y_{iv} - \bar{y}_v)^2}},$$

где u и v — номера компонентов, для которых оценивается корреляция; m — количество серий анализов.

Среднее значение выходной координаты, усредненное по всем сериям анализов для j -ого компонента, составило

$$\bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^m y_{ij}}{m}.$$

Результаты расчета коэффициентов корреляции приведены в табл. 3.

Правильность гипотезы о значимости коэффициента корреляции оценивали по критерию Стьюдента. Коэффициент корреляции считали значимым при выполнении условия:

$$t > t_{\text{кр}}(\alpha, f),$$

где t и $t_{\text{кр}}$ — соответственно наблюдаемое и критическое значения критерия Стьюдента, α — уровень значимости, f — число степеней свободы:

$$f = n - 2,$$

где n — количество компонентов хроматограммы на участке программирования температуры.

Наблюдаемое значение критерия Стьюдента

$$t = \frac{r_{uv} \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r_{uv}^2}}.$$

Если в последнюю формулу подставить вместо наблюдаемого значения критерия Стьюдента критическое и разрешить ее относительно коэффициента корреляции, то получим его минимальное значение, при котором наличие корреляции будет оцениваться положительно.

Для доверительной вероятности $p = 0.95$ и $n = 11$ при двусторонней альтернативной гипотезе критическое значение $t_{\text{кр}}(0.05, 9) = 2.26$ [14]. Тогда минимальное значение $r_{uv}^{\text{мин}} = 0.60$. Соответственно этому значению ситуацию наличия или отсутствия корреляции между СО времени хроматографического удерживания отдельных компонентов иллюстрирует табл. 4. “Да” означает наличие корреляции в строке табл. 4, “нет” — ее отсутствие. Подсчет относительной частоты наличия корреляции между отдельными компонентами (рис. 3) показал, что в 80% случаев СО времен хроматографического удерживания соседних пиков коррелируют между собой. Таким образом, в целом корреляция между погрешностями определения входной величины имеет место.

Таблица 2. Результаты расчетов выходной координаты u_{ij} (стандартное отклонение времени хроматографического удерживания)

Номер серии измерений	Номер компонента на этапе программирования температуры										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2×10^{-3}	2.309×10^{-3}	2.517×10^{-3}	3.055×10^{-3}	1.155×10^{-3}	1.528×10^{-3}	1.155×10^{-3}	5.568×10^{-3}	7.234×10^{-3}	2.409×10^{-2}	3.027×10^{-2}
2	0	1.000×10^{-3}	10×10^{-4}	1.528×10^{-3}	3.055×10^{-3}	2.082×10^{-3}	1.155×10^{-3}	4.619×10^{-3}	5.292×10^{-3}	4.359×10^{-3}	7.506×10^{-3}
3	5.744×10^{-4}	10×10^{-4}	5.774×10^{-4}	2.309×10^{-3}	2.887×10^{-3}	6.083×10^{-3}	6.506×10^{-3}	1.212×10^{-2}	1.665×10^{-2}	2.666×10^{-2}	3.027×10^{-2}
4	2.082×10^{-3}	2.082×10^{-3}	3.215×10^{-3}	3×10^{-3}	6.028×10^{-3}	4.041×10^{-3}	2.517×10^{-3}	3×10^{-3}	7×10^{-3}	1.553×10^{-2}	2.095×10^{-2}
5	2×10^{-3}	2×10^{-3}	5.774×10^{-4}	3×10^{-3}	4.359×10^{-3}	3.215×10^{-3}	3.512×10^{-3}	4.359×10^{-3}	4.619×10^{-3}	1.323×10^{-2}	1.815×10^{-2}
6	1.155×10^{-3}	1.732×10^{-3}	2×10^{-3}	1.155×10^{-3}	2.082×10^{-3}	4.583×10^{-3}	2.309×10^{-3}	3.786×10^{-3}	1.058×10^{-3}	1.877×10^{-2}	2.627×10^{-3}
7	2.646×10^{-3}	2.082×10^{-3}	2×10^{-3}	3.055×10^{-3}	6.658×10^{-3}	9.074×10^{-3}	7.638×10^{-3}	1.401×10^{-2}	1.858×10^{-2}	2.6×10^{-2}	3.251×10^{-2}
8	1.155×10^{-3}	5.774×10^{-4}	2.082×10^{-3}	1.528×10^{-3}	2.309×10^{-3}	10×10^{-4}	1.155×10^{-3}	5.774×10^{-4}	2.646×10^{-3}	3.606×10^{-3}	3.055×10^{-3}
9	7×10^{-4}	1.35×10^{-3}	3.384×10^{-3}	4.717×10^{-3}	6.772×10^{-3}	8.316×10^{-3}	1.291×10^{-2}	1.466×10^{-2}	1.775×10^{-2}	2.498×10^{-2}	2.297×10^{-2}
10	7×10^{-4}	1.501×10^{-3}	1.795×10^{-3}	2.309×10^{-3}	3.656×10^{-3}	3.055×10^{-3}	4.355×10^{-3}	5.205×10^{-3}	6.03×10^{-3}	4.693×10^{-3}	8.166×10^{-3}

Таблица 3. Коэффициенты линейной парной корреляции стандартного отклонения времен хроматографического удерживания компонентов

Номер компонента на этапе программирования температуры	Номер компонента на этапе программирования температуры										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	1	0.771	0.259	0.304	0.3	0.186	-5.657×10^{-2}	1.958×10^{-2}	7.897×10^{-2}	0.38	0.49
1	0.771	1	0.275	0.391	0.233	0.18	-2.2×10^{-2}	8.087×10^{-2}	0.109	0.449	0.604
2	0.259	0.275	1	0.49	0.38	0.206	0.271	8.08×10^{-2}	0.162	0.216	0.13
3	0.304	0.391	0.49	1	0.681	0.55	0.744	0.63	0.485	0.546	0.397
4	0.3	0.233	0.38	0.681	1	0.735	0.702	0.552	0.504	0.27	0.183
5	0.186	0.391	0.206	0.55	0.735	1	0.869	0.89	0.941	0.709	0.624
6	-5.657×10^{-2}	-2.2×10^{-2}	0.271	0.744	0.702	0.869	1	0.888	0.823	0.57	0.383
7	1.958×10^{-2}	8.087×10^{-2}	8.08×10^{-2}	0.63	0.552	0.89	0.888	1	0.94	0.745	0.617
8	7.897×10^{-2}	0.109	0.162	0.485	0.504	0.941	0.823	0.94	1	0.828	0.733
9	0.38	0.449	0.216	0.546	0.27	0.709	0.57	0.745	0.828	1	0.96
10	0.49	0.604	0.13	0.397	0.183	0.624	0.383	0.617	0.733	0.96	1

Таблица 4. Оценка наличия корреляции стандартного отклонения времен хроматографического удерживания компонентов

Номер компонента на этапе программирования температуры	Номер компонента на этапе программирования температуры											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	1	Да	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
1	Да	1	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Да
2	Нет	Нет	1	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
3	Нет	Нет	Нет	1	Да	Нет	Да	Да	Нет	Нет	Нет	Нет
4	Нет	Нет	Нет	Да	1	Да	Да	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
5	Нет	Нет	Нет	Нет	Да	1	Да	Да	Да	Да	Да	Да
6	Нет	Нет	Нет	Да	Да	Да	1	Да	Да	Нет	Нет	Нет
7	Нет	Нет	Нет	Да	Нет	Да	Да	1	Да	Да	Да	Да
8	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Да	Да	Да	1	Да	Да	Да
9	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Да	Нет	Да	Да	1	Да	Да
10	Нет	Да	Нет	Нет	Нет	Да	Нет	Да	Да	Да	Да	1

Равноточность измерений при определении входной величины оценивали путем проверки однородности дисперсий входной величины отдельного компонента по всем сериям измерений.

Дисперсия ВХУ j -го компонента по всем сериям измерений составляет:

$$s^2(x_j) = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{\ell=1}^k (x_{jil} - \bar{x}_j)^2}{mk - 1}.$$

Среднее значение ВХУ j -го компонента в серии по всем сериям измерений:

$$\bar{x}_j = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{\ell=1}^k x_{jil}}{mk}.$$

Результаты расчетов приведены в табл. 5.

Гипотеза об однородности дисперсий принимается при выполнении условия:

$$G < G_{кр}(\alpha, f_1, n),$$

где G и $G_{кр}$ – соответственно наблюдаемое и критическое значения критерия Кохрена, f_1 – число степеней свободы отдельной дисперсии, n – количество суммируемых дисперсий, равное количеству компонентов:

$$f_1 = mk - 1, \quad G = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{j=1}^n s^2(x_j)},$$

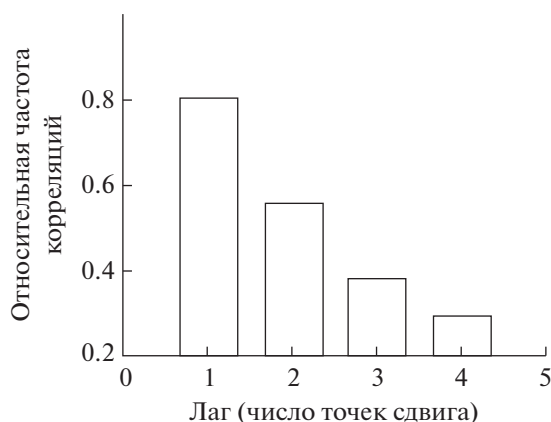


Рис. 3. Данные о наличии корреляций между стандартным отклонением времен хроматографического удерживания отдельных компонентов.

Таблица 5. Результаты измерений и расчетов в отдельных точках 1–10

Обозначение параметра	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Время хроматографического удерживания (входная величина)											
\bar{x}_j , мин	5.110	5.396	6.266	6.529	7.172	7.773	8.254	9.367	10.292	13.019	14.249
СО входной величины											
$s(x_j)$	2.091×10^{-3}	3.189×10^{-3}	3.145×10^{-3}	3.685×10^{-3}	5.131×10^{-3}	7.286×10^{-3}	6.894×10^{-3}	9.229×10^{-3}	1.222×10^{-2}	1.967×10^{-2}	2.273×10^{-2}
$s(\bar{x}_j)$	3.817×10^{-4}	5.821×10^{-4}	5.743×10^{-4}	6.728×10^{-4}	9.367×10^{-4}	1.330×10^{-3}	1.259×10^{-3}	1.685×10^{-3}	2.230×10^{-3}	3.597×10^{-3}	4.150×10^{-3}
СО времени хроматографического удерживания (выходная величина)											
y_j , мин	2×10^{-3}	2.309×10^{-3}	2.517×10^{-3}	3.055×10^{-3}	1.155×10^{-3}	1.528×10^{-3}	1.155×10^{-3}	5.568×10^{-3}	7.234×10^{-3}	2.409×10^{-2}	3.027×10^{-2}
0	1.000×10^{-3}	10×10^{-4}	10×10^{-4}	1.528×10^{-3}	3.055×10^{-3}	2.082×10^{-3}	1.155×10^{-3}	4.619×10^{-3}	5.292×10^{-3}	4.359×10^{-3}	7.506×10^{-3}
5.744×10^{-4}	10×10^{-4}	5.774×10^{-4}	2.309×10^{-3}	2.887×10^{-3}	6.083×10^{-3}	6.506×10^{-3}	6.506×10^{-3}	1.212×10^{-2}	1.665×10^{-2}	2.666×10^{-2}	3.027×10^{-2}
2.082×10^{-3}	2.082×10^{-3}	3.215×10^{-3}	3×10^{-3}	6.028×10^{-3}	4.041×10^{-3}	2.517×10^{-3}	3×10^{-3}	3×10^{-3}	7×10^{-3}	1.553×10^{-2}	2.095×10^{-2}
2×10^{-3}	2×10^{-3}	5.774×10^{-4}	3×10^{-3}	4.359×10^{-3}	3.215×10^{-3}	3.512×10^{-3}	3.512×10^{-3}	4.359×10^{-3}	4.619×10^{-3}	1323×10^{-2}	1.815×10^{-2}
1.155×10^{-3}	1.732×10^{-3}	1.732×10^{-3}	2×10^{-3}	1.155×10^{-3}	2.082×10^{-3}	4.583×10^{-3}	2.309×10^{-3}	3.786×10^{-3}	1.058×10^{-3}	1.877×10^{-2}	2.627×10^{-3}
2.646×10^{-3}	2.082×10^{-3}	2.082×10^{-3}	2×10^{-3}	3.055×10^{-3}	6.658×10^{-3}	9.074×10^{-3}	7.638×10^{-3}	1.401×10^{-2}	1.858×10^{-2}	2.6×10^{-2}	3.251×10^{-2}
1.155×10^{-3}	5.774×10^{-4}	2.082×10^{-3}	1.528×10^{-3}	2.309×10^{-3}	10×10^{-4}	1.155×10^{-3}	1.155×10^{-3}	5.774×10^{-4}	2.646×10^{-3}	3.606×10^{-3}	3.055×10^{-3}
7×10^{-4}	1.35×10^{-3}	3.384×10^{-3}	4.717×10^{-3}	6.772×10^{-3}	8.316×10^{-3}	1.291×10^{-2}	1.291×10^{-2}	1.466×10^{-2}	1.775×10^{-2}	2.498×10^{-2}	2.297×10^{-2}
7×10^{-4}	1.501×10^{-3}	1.795×10^{-3}	2.309×10^{-3}	2.309×10^{-3}	3.656×10^{-3}	3.055×10^{-3}	4.355×10^{-3}	5.205×10^{-3}	6.03×10^{-3}	4.693×10^{-3}	8.166×10^{-3}
Среднее значение выходной величины в i -ой точке											
\bar{y}_j	1.301×10^{-3}	1.563×10^{-3}	1.915×10^{-3}	2.566×10^{-3}	3.896×10^{-3}	4.298×10^{-3}	4.321×10^{-3}	6.791×10^{-3}	9.639×10^{-3}	1.619×10^{-2}	2.001×10^{-2}
СО единичного измерения выходной величины в i -ой точке											
$s(y_j)$	8.417×10^{-4}	5.744×10^{-4}	9.822×10^{-4}	1.042×10^{-3}	1.933×10^{-3}	2.758×10^{-3}	3.765×10^{-3}	4.936×10^{-3}	5.913×10^{-3}	9.381×10^{-3}	1.056×10^{-2}
СО среднего значения выходной величины в i -ой точке											
$s(\bar{y}_j)$	2.662×10^{-4}	1.816×10^{-4}	3.106×10^{-4}	3.294×10^{-4}	6.304×10^{-4}	8.722×10^{-4}	1.190×10^{-3}	1.561×10^{-3}	1.870×10^{-3}	2.966×10^{-3}	3.339×10^{-3}

где s_{\max}^2 — максимальная из сравниваемых дисперсий.

По результатам расчетов получено, что $G = 0.397$; при этом критическое значение $G_{\text{кр}}(0.05, 29, 11) = 0.165$ [18, с. 469].

Таким образом, неопределенность уравнения регрессии необходимо рассчитывать для случая

наличия корреляции между погрешностями определения входной величины и отсутствия равноточности измерений при определении входной величины.

В данном случае суммарная стандартная неопределенность однократного измерения выходной величины y определяется по формуле [15]:

$$u_{\Sigma}(y|x) = s_{\Sigma}(y|x) = \sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^n (\bar{x}_j - \bar{x})^2}\right) s^2(\bar{y}) + b^2 \frac{\left(\frac{\sum_{i=1}^n s(x_j)^2}{n^2} + \frac{(x - \bar{x})^2 \left(\sum_{i=1}^n s(x_j)(\bar{x}_j - \bar{x})\right)^2}{\left(\sum_{i=1}^n (\bar{x}_j - \bar{x})^2\right)^2}\right)}, \quad (1)$$

где $u_{\Sigma}(y|x)$ — суммарная стандартная неопределенность однократного измерения выходной величины y в точке x ; $s_{\Sigma}(y|x)$ — СО суммарной погрешности однократного измерения выходной величины y в точке x ; n — количество условных средних, используемых для оценки неопределенности уравнения регрессии, равное количеству компонентов хроматограммы на участке программирования температуры; x — входная координата уравнения регрессии (время хроматографического удерживания); \bar{x}_j — среднее значение входной координаты в j -ой точке уравнения регрессии; $s(x_j)$ — СО значения входной координаты в j -ой точке; \bar{x} — общее среднее значение входной координаты; y — выходная координата уравнения регрессии (СО времени хроматографического удерживания); $s^2(\bar{y})$ — дисперсия общего среднего значения выходной координаты; b — коэффициент регрессии.

Дисперсия общего среднего значения выходной величины:

$$s^2(\bar{y}) = \frac{\sum_{j=1}^n s^2(\bar{y}_j)}{n},$$

где $s^2(\bar{y}_j)$ — дисперсия среднего значения выходной координаты в j -ой точке уравнения регрессии:

$$s^2(\bar{y}_j) = \frac{s^2(y_j)}{m},$$

где $s^2(y_j)$ — дисперсия выходной координаты в j -ой точке уравнения регрессии:

$$s^2(y_j) = \frac{\sum_{i=1}^m (y_{ij} - \bar{y}_j)^2}{m - 1}.$$

Промежуточные результаты расчетов представлены в табл. 6. Используя их, нетрудно определить порядки величин, входящих в уравнение (1):

$$\frac{1}{n} \approx 10^{-1}, \quad s^2(\bar{y}) \approx 10^{-6}, \quad b \approx 10^{-3}, \quad \sum_{i=1}^n s(x_j) \approx 10^{-1}.$$

Тогда

$$\frac{s^2(\bar{y})}{n} \approx 10^{-7}, \quad b^2 \frac{\left(\sum_{i=1}^n s(x_j)\right)^2}{n^2} \approx 10^{-10}.$$

Таким образом,

$$\frac{s^2(\bar{y})}{n} \gg b^2 \frac{\left(\sum_{i=1}^n s(x_j)\right)^2}{n^2}.$$

Аналогично

$$\sum_{j=1}^n (\bar{x}_j - \bar{x})^2 \approx 10^2, \quad \sum_{i=1}^n s(x_j)(\bar{x}_j - \bar{x}) \approx 10^{-1}.$$

Тогда

$$\frac{s^2(\bar{y})}{\sum_{j=1}^n (\bar{x}_j - \bar{x})^2} \approx 10^{-8}, \quad \frac{b^2 \left(\sum_{i=1}^n s(x_j)(\bar{x}_j - \bar{x})\right)^2}{\left(\sum_{i=1}^n (\bar{x}_j - \bar{x})^2\right)^2} \approx 10^{-12}.$$

Таким образом,

$$\frac{s^2(\bar{y})}{\sum_{j=1}^n (\bar{x}_j - \bar{x})^2} \gg \frac{b^2 \left(\sum_{i=1}^n s(x_j)(\bar{x}_j - \bar{x})\right)^2}{\left(\sum_{i=1}^n (\bar{x}_j - \bar{x})^2\right)^2}.$$

Таблица 6. Промежуточные результаты расчетов

j	\bar{x}_j	$\bar{x}_j - \bar{\bar{x}}$	$(\bar{x}_j - \bar{\bar{x}})^2$	$s(x_j)$	$s(x_j)(\bar{x}_j - \bar{\bar{x}})$	$s^2(\bar{y}_j)$
0	5.110	-3.384	11.450	2.091×10^{-3}	-7.075×10^{-3}	7.085×10^{-8}
1	5.396	-3.097	9.454	3.189×10^{-3}	-9.876×10^{-3}	3.299×10^{-8}
2	6.266	-2.227	4.961	3.145×10^{-3}	-7.006×10^{-3}	9.647×10^{-8}
3	6.529	-1.964	3.858	3.685×10^{-3}	-7.238×10^{-3}	1.085×10^{-7}
4	7.172	-1.322	1.746	5.131×10^{-3}	-6.780×10^{-3}	3974×10^{-7}
5	7.773	-0.720	0.519	7.286×10^{-3}	-5.248×10^{-3}	7.608×10^{-7}
6	8.254	-0.239	5.723×10^{-2}	6.894×10^{-3}	-1.649×10^{-3}	1.417×10^{-6}
7	9.367	0.873	0.763	9.229×10^{-3}	8.060×10^{-3}	2.436×10^{-6}
8	10.292	1.799	3.236	1.222×10^{-2}	2.198×10^{-2}	3.496×10^{-6}
9	13.019	4.526	20.484	1.967×10^{-2}	8.902×10^{-2}	8.800×10^{-6}
10	14.249	5.756	33.129	2.273×10^{-2}	0.131	1.115×10^{-5}
Σ	93.430	—	89.797	9.527×10^{-2}	0.205	2.876×10^{-5}
Среднее значение	8.494	—	—	—	—	2.615×10^{-6}

Из полученных неравенств следует, что вторым слагаемым в формуле (1) можно пренебречь, и данная формула примет вид:

$$s_{\Sigma}(y|x) = s(\bar{y}) \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{\bar{x}})^2}{\sum_{i=1}^n (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}}$$

После подстановки числовых данных в итоге получена следующая функция, описывающая

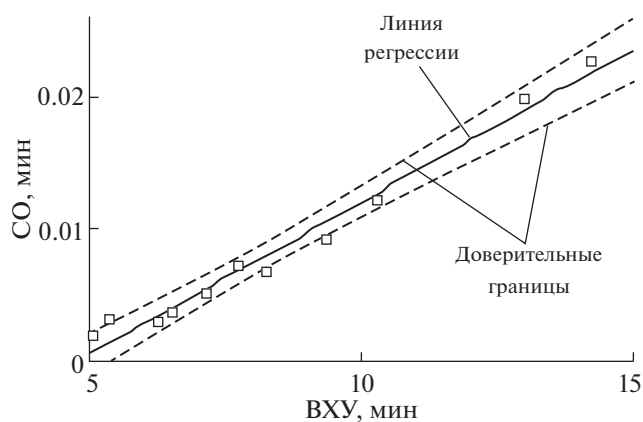


Рис. 4. Соответствие расчетных и экспериментальных данных по стандартному отклонению на этапе программирования температуры.

оценку CO суммарной погрешности (суммарной стандартной неопределенности) уравнения регрессии:

$$s_{\Sigma}(y|x) = 1.707 \times 10^{-4} \times \sqrt{8.161 + (x - 8.494)^2}$$

Результирующий график, на котором изображены экспериментальные данные, кривая регрессии и доверительные интервалы, приведен на рис. 4. Коэффициент охвата при переходе к рас-

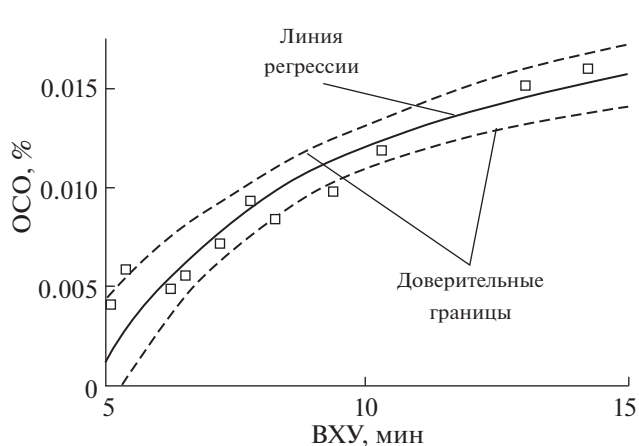


Рис. 5. Оценка относительного стандартного отклонения.

ширенной неопределенности принят равным двум [15].

Поскольку в хроматографии для характеристики прецизионности широко применяется относительное СО, те же зависимости приведены и для этого параметра (рис. 5). Как видно, в режиме программирования температуры хроматографической колонки ОСО ВХУ не превышает 0.2%.

* * *

Таким образом, для случая внутрिलाбораторной прецизионности с изменением фактора “время” на примере газового хроматографа Хроматэк-Кристалл-5000.1 установлено следующее: 1) при дозировании пробы вручную в режиме одноступенчатого программирования температуры колонки фактически достижимая величина ОСО ВХУ не превышает 0.2 отн. %, что существенно увеличивает надежность идентификации компонентов пробы по сравнению с заявленной в описании типа средства измерения для изотермического режима; 2) стандартное отклонение времени хроматографического удерживания зависит от температуры хроматографической колонки и в режиме программирования температуры его значение существенно увеличивается; 3) полученная функциональная метрологическая характеристика уравнения регрессии позволяет рассчитать суммарную стандартную неопределенность в оценке стандартного отклонения времени хроматографического удерживания. Полученные результаты могут быть использованы для расчета доверительного интервала времени хроматографического удерживания, обеспечивающего достоверную идентификацию веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яшин Я.И., Яшин А.Я. Основные тенденции развития хроматографии после 110-летия со дня ее открытия М.С. Цветом // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14. № 2. С. 203.
2. Крылов А.И. Разработка и совершенствование методов идентификации и определения органических аналитов в пробах неизвестного состава. Автореф. дис. ... докт. хим. наук. Всероссийский научно-исследовательский институт им. Д.И. Менделеева (ВНИИМ). 2012. 37 с. https://disser.spbu.ru/disser/%7Bzashiti_disser___id%7D/avtoref-Krillov.pdf (10.11.2020).
3. Зенкевич И.Г., Елисеенков Е.В., Касаточкин А.Н. Идентификация продуктов органических реакций при отсутствии аддитивности хроматографических индексов удерживания. Хлорпроизводные метилтрет-бутилкетона // Журн. структ. химии. 2013. Т. 54. № 3. С. 453. (Zenkevich I.G., Eliseenkov E.V., Kasatochkin A.N. Identification of organic reaction products in the absence of additivity of chromatographic retention indices. Chlorinated derivatives of methyl tert-butyl ketone // J. Struct. Chem. 2013. V. 54. № 3. P. 453 (Russ.).)
4. База данных Национального института стандартов и технологий США. The NIST 20 Mass Spectral Library & Search Software (NIST 2020/2017/EPA/NIH) <https://www.sisweb.com/software/ms/nist.htm> (20.11.2020).
5. Описание типа средства измерений. Комплексы хроматографические газовые “Хромос GX-1000”. Приложение к свидетельству № 53504 об утверждении типа средств измерений. <http://ndgsi.ru/grsi/210xx/21064-13.pdf> (03.09.2020).
6. Описание типа средства измерений. Комплексы аппаратно-программные для медицинских исследований на базе хроматографа “Хроматэк – Кристалл 5000”. Приложение к свидетельству № 55590 об утверждении типа средств измерений. <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/4/items/372060> (03.09.2020).
7. Рекомендации по межгосударственной стандартизации РМГ 61-2010. ГСОЕИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: Стандартинформ, 2012. 59 с. <http://docs.cntd.ru/document/1200094703> (03.09.2020).
8. ГОСТ 31754-2012 Масла растительные, жиры животные и продукты их переработки. Методы определения массовой доли трансизомеров жирных кислот. М.: Стандартинформ, 2014. 32 с. <http://docs.cntd.ru/document/1200100241> (03.09.2020).
9. Николаев А.В. О химическом составе и новых фракциях препарата АСД // Труды ВИЭВ. 1959. Т. 22. С. 317.)
10. Абрамов В.Е., Абдрахманов В.И., Дорогова О.А., Кирюткин Г.В., Краснов В.Л. Определение показателей качества препарата АСД-2 // Ветеринария. 2004. № 9. С. 13
11. Абдрахманов В.И., Краснов В.Л., Логотов В.И., Орлов А.В., Сахинов В.Р. Исследование химического состава субстанции АСД-2Ф хроматографическими методами // Международный журн. прикладных и фундаментальных исследований. 2019. № 6. С. 168.
12. Васина Я.А., Смельцова И.Л., Фаерман В.И., Яблоков В.А. Продукты твёрдофазного термического превращения L-α-аминокислот в вакуумированной системе // Universum: Химия и биология: электрон. науч. журн. 2016. № 11(29). <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/3827> (03.09.2020).
13. ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. <http://docs.cntd.ru/document/1200029976> (03.09.2020).
14. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. <http://docs.cntd.ru/document/1200029975> (03.09.2020).
15. Р 50.2.028-2003 Рекомендации по метрологии. ГСОЕИ. Алгоритмы построения градуировочных характеристик средств измерений состава веществ

- и материалов и оценивание их погрешностей (неопределенностей). Оценивание погрешности (неопределенности) линейных градуировочных характеристик при использовании метода наименьших квадратов. М.: Издательство стандартов, 2003. 7 с. <http://docs.cntd.ru/document/1200032032> (03.09.2020).
16. ГОСТ Р 8.736-2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов измерений. Основные положения. М.: Стандартинформ, 2019. 21 с. <http://docs.cntd.ru/document/1200089016> (03.09.2020).
17. РМГ 29-2013 Рекомендации по межгосударственной стандартизации. Государственная система обеспечения единства измерений. Метрология. Основные термины и определения. М.: Стандартинформ, 2014. 121 с. <http://docs.cntd.ru/document/1200115154> (03.09.2020).
18. Гмурман В.Е. Теория вероятностей и математическая статистика: Учебное пособие для вузов. М.: Высшая школа, 2003. 479 с.