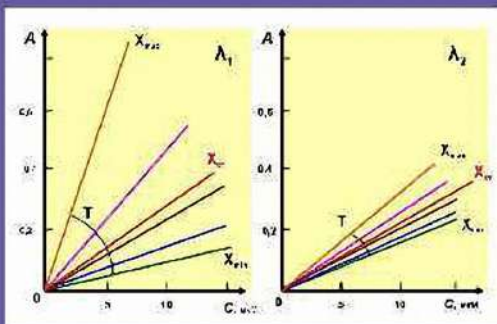


В. И. Вершинин

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ ОДНОТИПНЫХ ВЕЩЕСТВ

(ТЕОРИЯ ИНТЕГРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ)



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
ОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. Ф.М. ДОСТОЕВСКОГО

В. И. ВЕРШИНИН

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ
ОДНОТИПНЫХ ВЕЩЕСТВ
(ТЕОРИЯ ИНТЕГРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ)**

Омск



2016

УДК 543.39
ББК 24.4
В370

Рекомендовано к изданию научно-техническим советом ОмГУ

Рецензенты:

д-р хим. наук, зав. кафедрой аналитической химии и химической экологии
Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского *Т.Ю. Русанова*;
д-р хим. наук, зав. кафедрой аналитической химии
Башкирского государственного университета *В.Н. Майстренко*;
д-р хим. наук, профессор кафедры органической химии
Омского государственного университета им. Ф.М. Достоевского *И.В. Кулаков*

Вступительная статья академика РАН *Ю.А. Золотова*

Вершинин, В. И.

В370 Определение суммарного содержания однотипных веществ (теория интегральных показателей) : монография / В. И. Вершинин ; [вступ. ст. акад. РАН Ю. А. Золотова]. – Омск : Изд-во Ом. гос. ун-та, 2016. – 288 с.

ISBN 978-5-7779-2025-6

Кратко изложены и обобщены результаты новых исследований автора, одного из ведущих российских специалистов в области аналитической химии, проведенных в 2005–2016 гг. при поддержке Минобрнауки и РФФИ. Изучены методы определения суммарного содержания однотипных органических веществ без их разделения. Такие методы и соответствующие им интегральные показатели (фенольный индекс, общий белок, ХПК, антиоксидантная активность и др.) давно применяются в анализе объектов окружающей среды, нефтепродуктов, пищевых продуктов и биообъектов, но впервые стали объектом теоретических и метрологических исследований. С единых позиций автором рассмотрены проблемы формирования групп однотипных веществ, способы измерения интегральных показателей, источники систематических погрешностей; предложены способы их снижения. Создание теории интегральных показателей позволило автору и его ученикам разработать и применить в практике новые, значительно более точные способы определения суммарного содержания углеводов, фенолов, антиоксидантов и других групп однотипных веществ. В основу книги легли более 20 статей автора, опубликованных в ведущих отечественных и международных научных журналах.

Для специалистов, разрабатывающих и применяющих методики химического анализа органических веществ. В качестве учебного пособия будет полезна магистрантам и аспирантам, специализирующимся в области аналитической и органической химии, а также экологии и химической технологии.

**УДК 543.39
ББК 24.4**

ISBN 978-5-7779-2025-6

© Вершинин В. И., 2016
© ФГБОУ ВО «ОмГУ
им. Ф.М. Достоевского», 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

К читателям	7
Предисловие	9
Список сокращений и условных обозначений	11
ВВЕДЕНИЕ	13
ГЛАВА 1. Однотипные вещества и способы определения их суммарного содержания	
1.1. Принципы формирования групп совместно определяемых веществ	19
1.2. Группы однотипных веществ	26
1.3. Способы определения суммарного содержания однотипных веществ	27
1.3.1. Прямое определение c_{Σ}	31
1.3.2. Косвенные методы.....	32
1.3.3. Оценка суммарного содержания аналитов в пересчете на $X_{\text{ст}}$	34
1.4. Способы измерения обобщенных аналитических сигналов	36
1.5. Особенности некоторых групп однотипных веществ	42
1.5.1. Углеводороды в составе природных и сточных вод.....	42
1.5.2. Фенолы в составе природных и сточных вод.....	46
1.5.3. Антиоксиданты в составе пищевых продуктов.....	49
ГЛАВА 2. Интегральные показатели и их виды	
2.1. Общая характеристика интегральных показателей	55
2.1.1. Терминологические проблемы	55
2.1.2. Взаимосвязь разных показателей	58
2.1.3. Дефиниция интегральных показателей.....	64
2.2. Метрологические аспекты применения интегральных показателей.....	67
2.2.1. Специфика интегральных показателей с точки зрения метролога	67
2.2.2. Множественность интегральных показателей	70
2.2.3. Многозначность интегральных показателей.....	75
2.3. Классификация интегральных показателей.....	76

2.4. Неопределенность интегральных показателей	82
2.4.1. Способы выявления систематических погрешностей	82
2.4.2. Источники систематических погрешностей.....	85
2.5. Влияние посторонних веществ на величину интегрального показателя	89

ГЛАВА 3. Внутригрупповая селективность аналитических сигналов как источник неопределенности интегральных показателей

3.1. Внутригрупповая селективность аналитических сигналов.....	95
3.1.1. Роль и количественная оценка внутригрупповой селективности.....	95
3.1.2. Причины разной чувствительности определения однотипных веществ.....	98
3.1.3. Прогнозирование коэффициентов чувствительности	104
3.2. Смеси известного состава: прогнозирование систематической погрешности	110
3.2.1. Используемая модель и вывод расчетных формул.....	111
3.2.2. Экспериментальная проверка предложенного алгоритма ..	115
3.3. Смеси неизвестного состава: прогнозирование предельной погрешности.....	121
3.3.1. Прогнозирование $\delta_{с_{max}}$ без учета свойств $X_{ст}$	122
3.3.2. Прогнозирование $\delta_{с_{max}}$ с учетом свойств стандартного вещества.....	124
3.3.3. Прогнозирование $\delta_{с_{max}}$ с учетом концентрации $X_{ст}$ в пробах.....	127
3.3.4. Экспериментальная проверка алгоритмов оценки предельной погрешности	129

ГЛАВА 4. Неаддитивность аналитических сигналов как источник неопределенности интегральных показателей

4.1. Общая характеристика и причины неаддитивности светопоглощения	135
4.2. Выявление статистически значимых отклонений от аддитивности.....	140
4.2.1. Первый способ	141
4.2.2. Второй способ	144
4.2.3. Третий способ	147
4.3. Прогнозирование отклонений от аддитивности с учетом состава смеси	151
4.3.1. Использование содержательных моделей	151

4.3.2. Использование статистических моделей	153
4.4. Применение разработанных алгоритмов в анализе смесей разного типа	159
4.5. Пути уменьшения влияния неаддитивности на правильность оценки c_{Σ}	163
ГЛАВА 5. Как повысить точность оценок суммарного содержания однотипных веществ?	
5.1. Постановка проблемы	165
5.2. Оптимизация способа формирования обобщенного сигнала	170
5.2.1. Выбор основного реагента	170
5.2.2. Подбор вспомогательных реагентов	175
5.2.3. Добавление нивелирующих реагентов	177
5.2.4. Варьирование концентрационных условий	180
5.3. Выбор способов измерения сигнала и расчета интегрального показателя	184
5.3.1. Выбор метода определения суммарного содержания углеводородов	184
5.3.2. Применение многоволновых измерений	192
5.3.3. Измерение интегральных интенсивностей	194
5.3.4. Влияние способа расчета интегрального показателя	196
5.4. Выбор стандартного вещества	200
5.4.1. Требования к стандартным веществам	200
5.4.2. Подбор стандартов при определении некоторых групп веществ	206
5.5. Методики и результаты анализа реальных объектов	210
5.5.1. Способ определения суммарного содержания фенолов	211
5.5.2. ИК-спектрометрический способ определения суммарного содержания нефтепродуктов в сточных и сильно загрязненных природных водах	217
5.5.3. Спектрофотометрический способ измерений суммарной антиоксидантной активности пищевых продуктов	223
ГЛАВА 6. Определение суммарного содержания однотипных веществ с использованием множества стандартов. Многомерные градуировки и интервальные оценки	
6.1. Построение и применение многомерных градуировок	227
6.1.1. Методологические аспекты проблемы	227

6.1.2. Многомерные градуировки для определения углеводородов	231
6.1.3. Анализ водных растворов. Учет потерь	236
6.1.4. Анализ природных и сточных вод с применением многомерных градуировок	238
6.2. Многомерные градуировки при определении отдельных групп УВ в бензине	242
6.2.1. Структурно-групповой состав бензинов и способы его определения	242
6.2.2. Построение математических моделей	247
6.2.3. Результаты анализа бензинов с помощью многомерных градуировок	251
6.3. Интервальные оценки суммарного содержания одготипных веществ	255
6.3.1. Взаимосвязь суммарных содержаний и обогщенных сигналов	255
6.3.2. Расчет интервальных оценок по величине интегрального показателя	257
6.3.3. Проверка выведенных формул	261
6.3.4. Интервальные оценки в анализе реальных объектов	267
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	269
ЛИТЕРАТУРА	273

К ЧИТАТЕЛЯМ

Определение содержания индивидуальных органических соединений в их сложных смесях, хотя и осуществляется в больших масштабах (прежде всего хроматографическими методами), во многих случаях слишком трудоемко, сложно, а иногда и фактически нецелесообразно. Последнее имеет место особенно в тех случаях, когда группа однотипных соединений обладает сходными структурными или функциональными характеристиками и когда достаточно каким-либо образом определить суммарное содержание компонентов этой группы. Оценка таких обобщенных или интегральных показателей осуществляется довольно давно и весьма широко. В качестве примеров можно назвать определение общего органического углерода в водах, ХПК, фенольного индекса, суммарной антиоксидантной активности пищевых продуктов.

Однако фундаментальные основы этого подхода, а именно его теория и общая методология, развиты слабо. Точнее сказать, теория определения интегральных показателей состава не была разработана вовсе. Между тем такая теория необходима, так как в ее отсутствие трудно рационально компоновать группы однотипных соединений, правильно выбирать методы измерения аналитического сигнала и, особенно, решать метрологические проблемы подобных определений. Однако разработка теории определения интегральных показателей состава – задача весьма трудная. Взнявшиеся за это заслуживают похвалы уже за саму постановку задачи. Профессор В.И. Вершинин и его коллеги успешно решают эту проблему на протяжении ряда лет; известны их интересные журнальные публикации, относящиеся к интегральным показателям. И вот теперь – книга, обобщение, оригинальное рассмотрение теории и методологии. В книге много внимания уделено вопросам

классификации «обобщенных» (общих, суммарных и т. д.) показателей химического состава и, прежде всего, метрологическим аспектам определения таких показателей. Главным образом рассматриваются интегральные показатели (выделенные из «обобщенных»), когда осуществляется пересчет на какое-либо стандартное вещество.

Получилась очень интересная работа. Успех В.И. Вершинина предопределили ясное понимание значимости обсуждаемого направления, глубокое проникновение в его суть, широкий кругозор аналитика-исследователя и свойственные автору книги основательность и чувство ответственности. Помимо прочего, Вячеслав Исаакович Вершинин хорошо пишет, можно отметить логичность, «толковость» и одновременно легкость изложения весьма непростых вещей. Все сказанное позволяет считать книгу В.И. Вершинина нужной, оригинальной научной монографией, посвященной быстроразвивающемуся направлению.

Академик РАН Ю.А. Золотов



ПРЕДИСЛОВИЕ

В этой книге собраны и теоретически обобщены результаты исследований, проведенных в последние годы под руководством автора на кафедре аналитической химии Омского государственного университета им. Ф.М. Достоевского (далее – ОмГУ) . Исследования были посвящены широко применяемым, но недостаточно изученным методам определения суммарного содержания однотипных органических веществ (фенолов, углеводов, антиоксидантов, белков и т. п.) с применением интегральных показателей. Такие методы весьма важны для анализа природных и сточных вод, пищевых продуктов, нефтепродуктов и биообъектов, они не требуют разделения сложных смесей веществ, не нуждаются в сложной и дорогой аппаратуре. Проблема только в том, как сделать эти методы достаточно точными. Вряд ли можно добиться этого, работая лишь с одной группой веществ; нужна общая теория, которую можно использовать для определения любой группы веществ. В данной книге представлен первый набросок такой теории. Обобщающие монографии по методам определения суммарного содержания однотипных веществ ранее не издавались.

Автор надеется, что эта книга будет полезна не только аналитикам-исследователям, но и тем специалистам, которые изо дня в день определяют суммарные содержания однотипных веществ. Книга может быть полезным учебным пособием для будущих аналитиков (магистрантов и аспирантов). Независимо от того, кто будет читателем этой книги, он может прислать свои замечания и предложения по электронному адресу vyvershinin@yandex.ru; в случае переиздания книги они обязательно будут приняты во внимание.

В получении и обобщении данных приняли участие и были соавторами статей специалисты разных организаций, в том числе доктора наук И.В. Власова, В.И. Сафарова, Т.Г. Цюпко; кандидаты наук Т.В. Антонова, Ю.П. Богза, Н.В. Исаченко, Н.А. Николаева, А.С. Казаченко, С.В. Усова, М.А. Федорова; Р.М. Хатмуллина; инженер М.П. Кулешова, аспирант Н.С. Бриленок, а также некоторые студенты ОмГУ. Автор приносит всем им, а также сотрудникам издательства ОмГУ свою искреннюю благодарность. Полученные результаты были бы невозможны без финансовой поддержки Министерства науки и образования (госконтракт П 1103, госзадания 6.4461.2011 и 2014/147) и РФФИ (проекты 12-03-00446 и 16-03-00479), а также без организационной поддержки администрации ОмГУ и всего коллектива химического факультета.

В обсуждении плана и/или чернового варианта настоящей книги участвовали доктора химических наук Ю.М. Дедков, В.Н. Майстренко, И.В. Кулаков, Н.Я. Мокшина, Т.Г. Цюпко, Р.К. Чернова и другие специалисты; автор благодарит всех их за помощь и ценные замечания. Особой благодарности заслуживает академик Ю.А. Золотов, посоветовавший написать и издать данную книгу, а затем согласившийся написать к ней краткую вступительную статью. Этому замечательному человеку и выдающемуся ученому и посвящает свою книгу автор.

*В.И. Вершинин
Август 2016 г.*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- А/Г – соотношение суммарных содержаний альбуминов и глобулинов
- АДВ – аналитическая длина волны
- АК – аскорбиновая кислота
- АО – антиоксидант
- АОА – обобщенная (суммарная) антиоксидантная активность
- АПАВ – анионные поверхностно-активные вещества
- БИК – ближняя инфракрасная область спектра
- БПК – биохимическое потребление кислорода
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГЖХ – газожидкостная хроматография
- ГК – галловая кислота
- ГСО – государственный стандартный образец состава
- ДСК – диазотированная сульфаниловая кислота
- ИИИ – метод измерения интегральных интенсивностей
- ИП – интегральный показатель
- КВ – кверцетин
- КПАВ – катионные поверхностно-активные вещества
- КТ – катехол
- МВИ – методика выполнения измерений
- МНК – метод наименьших квадратов
- НПАВ – неионогенные поверхностно-активные вещества
- ОА – отклонение от аддитивности
- ПАВ – поверхностно-активное вещество
- ПГК – метод определения «общего белка» с пирогаллоловым красным
- ПДК – предельно допустимая концентрация
- ПКК – протокатеховая кислота
- ПФЭ – полный факторный эксперимент

РТ – рутин

c^* – числовое значение интегрального показателя, результат анализа

c_{Σ} – суммарное содержание однотипных веществ

$C_{\text{орг}}$ – суммарное содержание органических веществ в пересчете на углерод

СГС – структурно-групповой состав

ССК – метод определения «общего белка» с сульфосалициловой кислотой

T – внутригрупповая селективность, отношение максимального и минимального коэффициентов чувствительности для группы однотипных веществ

ТПК – термическое потребление кислорода

УВ – углеводороды

ФИ – фенольный индекс

ФК – феруловая кислота

ХПК – химическое потребление кислорода

CUPRAC – один из показателей АОА

DIP – 2,2'-дипиридил

FRAP – *ferric reducing antioxidant power*, один из показателей АОА

FZ – феррозин

ORAC – *oxygen radical absorbance capacity*, один из показателей АОА

РАНs – полициклические ароматические углеводороды

PHEN – *o*-фенантролин

PLS – метод проекции на латентные структуры

RMSEP – *root mean squared error of prediction*, обобщенная погрешность анализа для серии однотипных проб

TAC – *total antioxidant capacity*, то же, что АОА

TEAC – *trolox equivalent antioxidant capacity*, один из показателей АОА

TOC – *total organic carbon*, общий органический углерод

TPH – *total petroleum hydrocarbons*, углеводородный индекс

TPTZ – трипиридилтриазин

$X_{\text{ст}}$ – стандартное вещество

Z – посторонние (мешающие) вещества

ВВЕДЕНИЕ

Современный этап в развитии аналитической химии характеризуется преимущественным вниманием к анализу органических веществ (биообъекты, пищевые продукты, лекарственные препараты, нефтепродукты и т. п.). Быстро развиваются высокочувствительные и селективные инструментальные методы, нацеленные на обнаружение и количественное определение индивидуальных органических соединений, особенно биологически активных (эко-токсиканты, канцерогены, диагностические маркеры). Появляются все более совершенные и, увы, все более дорогие приборы, предназначенные для решения этих задач (хромато-масс-спектрометры и др.). Разрабатываются многочисленные стандартные методики анализа, совершенствуются нормативные документы. Однако *теоретическим исследованиям* в области анализа органических веществ уделяется явно недостаточное внимание.

Разные объекты анализа традиционно рассматриваются аналитиками по отдельности, хотя они имеют много общего – все они являются *смесями органических соединений*. Для смесей каждого типа (нефтепродуктов, лекарственных препаратов и т. п.) применяют собственный набор методов и методик анализа; для объектов каждого типа разрабатывают особые правила пробоотбора, специфические способы пробоподготовки и даже особенные способы расчета результатов анализа. К сожалению, проблемы, возникающие в ходе анализа смесей, также рассматривают, ограничиваясь смесями одного типа. Идеи и достижения аналитиков, занимающихся, например, анализом нефтепродуктов, недостаточно используются специалистами по анализу лекарственных препаратов, и наоборот. Очевидно, в дополнение к специфическим способам анализа отдельных объектов надо развивать *общую методологию*

анализа смесей органических веществ, нужны фундаментальные исследования в этой области аналитической химии.

Проблемы, возникающие в химическом анализе неразделенных смесей, как и способы решения этих проблем, зависят не столько от состава конкретной смеси, сколько от задачи, решаемой в ходе анализа, а также от выбранного подхода к ее решению (с разделением или без разделения компонентов смеси). Количественный анализ техногенных и природных смесей на молекулярном уровне включает четыре основные задачи [1]: **а)** определение некоторого компонента (X) в присутствии других компонентов пробы; **б)** раздельное определение ряда компонентов (X_1, X_2, X_3, \dots); **в)** определение суммарного содержания компонентов некоторой группы ($\sum X$); **г)** раздельное определение нескольких групп ($\sum X, \sum Y, \sum Z, \dots$). Проблемами во всех случаях являются межэталонные спектральные наложения и потери аналитов в ходе пробоподготовки. При определении суммарных содержаний (c_Σ) добавляются проблемы неаддитивности аналитических сигналов и неодинаковой чувствительности определения однотипных веществ. Серьезные трудности возникают также в связи с не полностью известным качественным составом пробы и влиянием посторонних веществ. Все перечисленные факторы приводят к систематическим погрешностям анализа, которые можно выявить, прогнозировать, исключить или хотя бы уменьшить, применяя специальные приемы обработки спектральных данных.

Наукометрический анализ публикаций показывает, что определению отдельных аналитов и раздельному определению ряда аналитов (первая и вторая задачи анализа смесей) сегодня уделяется значительно большее внимание, чем третьей. Нет книг, специально посвященных методам оценки суммарных содержаний. Нет соответствующих разделов в учебниках по аналитической химии, очень мало обзорных статей. А ведь в контрольно-аналитических лабораториях методики определения суммарных содержаний используются весьма широко. По оценкам специалистов, доля

соответствующих анализов составляет около 20 % [2]. Особенно высока эта доля в анализе объектов окружающей среды, биообъектов, пищевых продуктов и нефтепродуктов. Можно привести в качестве типичных примеров определение углеводов, фенолов и поверхностно-активных веществ в сточных водах [3; 4], определение «общего белка» в биологических жидкостях [5] и антиоксидантов в винах [6], а также определение показателей фракционного и структурно-группового состава нефтепродуктов [7]. Отказ от раздельного определения множества индивидуальных веществ ускоряет, удешевляет и упрощает анализ любых объектов, а потребители все же получают необходимую им информацию – при условии, что свойства совместно определяемых веществ достаточно близки (см. главу 1 настоящей книги). Если это не так, структурно родственные вещества, например канцерогенные полиарены, определяют по отдельности.

Способы решения задач типа (в) и родственных им, но еще более сложных задач типа (г) разрабатывались эмпирически начиная с 1930-х гг. Зачастую методики анализа соответствующих объектов создавали не профессиональные аналитики, а специалисты иного профиля (технологи, гидрохимики, биохимики). Вместо действительных значений c_{Σ} определяли и определяют *интегральные* показатели химического состава, выраженные в пересчете на некоторое стандартное вещество. Такой подход имеет свои несомненные преимущества, однако система интегральных показателей не была обоснована в методологическом и метрологическом отношениях, а результаты определения некоторых ИП (значения c^*) могут сильно отличаться от c_{Σ} (см. главы 2 и 3), на что не принято обращать внимание.

Недостаточное внимание суммарным оценкам уделялось и в последующие десятилетия, вплоть до конца XX в. Это не было случайностью. Несомненные достижения в области хроматографического анализа приводили к излишне оптимистическому мнению о том, что уже завтра этим методом можно будет быстро и легко установить детальный состав любых смесей. Исходя из

этого, некоторые аналитики стали считать методы молекулярного анализа неразделенных смесей устаревшими, а оценки суммарных содержаний – неактуальными. Недостаточное внимание исследователей к задачам типа (в) привело к тому, что не были выработаны общие правила их решения и соответствующие методические рекомендации, не созданы специфические расчетные алгоритмы и процедуры валидации. Не хватает стандартных образцов (СО), аттестованных по показателям группового состава. В целом теоретические и метрологические проблемы, возникающие при определении c_{Σ} , изучены совершенно недостаточно.

Внимание к суммарным оценкам усилилось только в последние годы XX в. Это было связано с двумя основными факторами:

1. Непрерывный рост числа нормируемых показателей состава объектов (прежде всего объектов окружающей среды) привел к осознанию нецелесообразности и даже экономической невозможности покомпонентного аналитического контроля. Стало понятно, что единственный выход – контролировать не содержания всех индивидуальных токсикантов в отдельности (за исключением некоторых, особо опасных или выбранных в качестве индикаторных веществ), а немногочисленные обобщающие характеристики, а именно суммарные содержания токсикантов каждой группы и зависящие от них интегральные показатели.

2. Стала очевидной необходимость более точной оценки суммарных содержаний. В частности, введение штрафов за сверхнормативные выбросы вредных веществ в окружающую среду привело к резкому усилению внимания к правильности результатов анализа, на основании которых назначаются штрафы. При этом сомнения вызывали именно результаты определения интегральных показателей (например, фенольного индекса), заведомо менее точные, чем результаты определения индивидуальных соединений. Внимание к этой проблеме еще более усилилось, когда работу испытательных лабораторий начали проверять независимые эксперты (официальная аккредитация лабораторий).

Принципиальное значение имела публикация одного из ведущих аналитиков Евросоюза – М. Валкарсея [2], положившая начало широкому обсуждению суммарных оценок и интегральных показателей химического состава. В обсуждении этой проблемы активно участвовали В. Мерц [8], Ю.А. Золотов [9], А.М. Воронцов [10], Ю.М. Дедков [11], А.А. Кленкин [12] и другие аналитики. Популярность нового научного направления стала быстро возрастать. Интересные варианты спектрометрического анализа неразделенных смесей предложили сотрудники Саратовского государственного университета (С.П. Муштакова). Особенно усилилось внимание к определению суммарного содержания антиоксидантов. Соответствующие исследования сегодня ведутся в Уральском государственном экономическом университете (Х.З. Брайнина), Кубанском государственном университете (Т.Г. Цюпко), Томском научно-исследовательском политехническом университете (Е.И. Короткова), Казанском (Приволжском) федеральном университете (Г.К. Зиятдинова) и в других организациях. Традиционное внимание интегральным показателям продолжают уделять специалисты в области экологического мониторинга и гидрохимического анализа (Ю.М. Дедков, А.М. Воронцов, В.И. Сафарова, К.Г. Боголицын и др.). Весьма интересные работы зарубежных исследователей преимущественно связаны с оценкой суммарного содержания антиоксидантов в пищевых продуктах и биообъектах, примером могут быть статьи [13; 14]. В последние годы журналы *Journal of Chemometrics* и *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* широко публикуют работы, в которых для оценки суммарных содержаний однотипных веществ используются хеометрические алгоритмы (см.: [15]).

Вышеперечисленные авторы изучают и определяют отдельные группы органических соединений, модифицируют и используют отдельные интегральные показатели, не рассматривая проблему в целом. Методологические и метрологические аспекты оценки суммарного содержания любых однотипных аналитов изучают сотрудники кафедры аналитической химии ОмГУ. При этом

используются разные методы измерения аналитических сигналов, преимущественно спектрометрические методы (в видимой и УФ-области спектра, а также в средней и ближней ИК-области). Проводится математическое моделирование методик и погрешностей анализа, используются хемометрические алгоритмы и многомерные градуировки. Объектами определения являются различные группы органических веществ: углеводороды, фенолы, моно- и дисахариды, антиоксиданты, ПАВ, полимерные коагулянты и др. При этом удалось выявить общие закономерности, не зависящие от природы определяемых веществ. Результатами исследований, выполненных в 2005–2016 гг. автором этой книги и его учениками, стали:

- обнаружение ранее неизвестных источников систематических погрешностей при оценке суммарных содержаний однотипных веществ с помощью интегральных показателей;
- новые способы выявления, моделирования и уменьшения этих погрешностей;
- систематизация известных и создание новых подходов к оценке содержаний, в частности способов определения c_{Σ} без пересчета на стандартное вещество;
- общие рекомендации для разработки методик определения суммарных содержаний;
- новые или существенно модифицированные методики анализа нефтепродуктов, пищевых продуктов, природных и сточных вод.

Полученные результаты опубликованы в отечественных и зарубежных научных журналах (свыше 20 статей), представлены на нескольких международных конференциях, а теперь собраны в этой книге.

Глава 1

ОДНОТИПНЫЕ ВЕЩЕСТВА И СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ

1.1. Принципы формирования групп совместно определяемых веществ

Чтобы определить содержание каких-либо однотипных веществ, необходимо прежде всего понять, в каком смысле эти вещества однотипны, какие именно признаки объединяют их в единую группу. Требуется уточнить перечень таких веществ (полный состав группы) и лишь затем подбирать или разрабатывать методику, обеспечивающую правильную оценку их суммарного содержания. К сожалению, аналитики не уделяют должного внимания данному вопросу, для большинства групп перечни компонентов не определены. Исключением являются группы особо опасных веществ, состав таких групп жестко регламентирован. Но эти вещества (приоритетные канцерогенные поларены, диоксины, компоненты химического оружия) определяют не суммарно, а порознь [16; 17].

Принципы формирования групп однотипных веществ не рассматриваются в учебниках и редко обсуждаются специалистами, хотя они важны и в теоретическом, и в практическом отношении. Учитывать состав группы однотипных веществ надо и при раздельном определении этих веществ, и при необходимости оценки их суммарного содержания. Так, антиоксиданты или белки обычно определяют суммарно; витамины, антибиотики и пищевые добавки – порознь, а углеводороды – и суммарно, и порознь, смотря по ситуации.

Анализ литературы показывает, что существуют три способа формирования групп однотипных веществ. Признаками, объединяющими их в единую группу, могут быть:

а) **Структурное сходство молекул.** Этот признак преимущественно используют в ходе научных исследований в области органической химии и биохимии.

б) **Сходство физико-химических характеристик, видов биологической активности, способов применения и т. п.** Классификационными признаками могут быть токсичность, канцерогенность, кислотность, температура кипения, растворимость и многие другие свойства веществ. Сходство свойств нередко вызвано сходством структуры молекул, но во многих случаях в группу совместно используемых или совместно контролируемых веществ входят соединения с несходной структурой. Перечни веществ, объединенных по важным для потребителя признакам, как и суммарные содержания этих веществ, учитывают в контроле качества продукции, в лабораторной диагностике, в экологическом мониторинге и при решении многих других прикладных задач [2].

в) **Сходство химико-аналитических свойств.** Можно объединять в группы вещества, которые, независимо от их структуры и способов применения, в ходе анализа совместно экстрагируются, или реагируют с одним и тем же титрантом, или поглощают свет при одной и той же аналитической длине волны. При разработке методик анализа группы часто формируют именно этим способом, даже если название группы указывает на иной принцип – на общность структуры или на сходные потребительские свойства компонентов.

Рассмотрим перечисленные выше варианты формирования групп более детально.

а) **Структурное сходство молекул.** Группы органических веществ часто формируют, учитывая наличие в их молекулах одинаковых заместителей (структурно-групповой или функциональный анализ) [18]. В частности, особые группы образуют фенолы, амины, карбоновые кислоты и т. п. Вещества, имеющие в составе

молекулы несколько разных заместителей, можно с равным успехом отнести к разным группам. Так, учитывая наличие соответствующих заместителей, триптофан или глицин можно отнести и к группе аминов, и к группе карбоновых кислот. Однако триптофан, глицин и подобные им вещества следует объединить, введя обобщающий термин «аминокислоты», выделяя тем самым соединения, одновременно имеющие в своих молекулах и карбоксильные группы, и аминогруппы. Желательно выделять структурные группы однотипных веществ таким образом, чтобы соответствующие множества веществ не пересекались. В этом случае отнесение каждого вещества к той или иной группе будет однозначным, а суммирование значений c_{Σ} для всех групп даст общее содержание органических веществ.

Можно объединять вещества и по признаку наличия в их молекулах тех или иных связей – двойных (непредельные соединения) или пептидных (полипептиды, в том числе белки). Еще один классификационный признак – наличие атомов некоторого элемента. Примером могут быть группы серосодержащих или азотсодержащих соединений. Суммарное содержание соответствующих анализов обычно выражают в пересчете на указанный элемент (интегральные показатели «общая сера», «общий азот», $C_{\text{орг}}$ и т. п.).

Естественно, структурные группы веществ могут быть сформированы на разном иерархическом уровне. Это значит, что одно и то же вещество может быть отнесено сразу к нескольким группам, последовательно входящим друг в друга. Например, бензол можно отнести и к группе аренов, и к более широкой группе углеводородов, и к предельно широкой группе органических веществ.

б) Сходство свойств, обеспечивающих сходное действие или совместное использование веществ. Аналогичные свойства могут иметь не только структурно родственные соединения, но и соединения с совершенно разной структурой. Это вызывает потребность в отдельной оценке суммарного содержания веществ со сходными свойствами, независимо от отнесения их к той или иной структурной группе. Из множества индивидуальных УВ можно

формировать не только разные структурные группы (арены, алканы, нафтенy и др.), но и группы совместно используемых УВ, независимо от их структуры. Такие группы (фракции) обычно формируют с учетом температуры кипения компонентов, не учитывая другие характеристики. Так, в состав бензиновой фракции входят и арены, и алканы, и нафтенy, и представители других структурных групп углеводородов. Единственное условие – температура кипения любого из них должна попасть в заданный для данной фракции интервал значений [7]. Таким образом, в анализе нефти применяют две разных схемы выделения групп. Данные по структурно-групповому и по фракционному составу нефти в практическом отношении хорошо дополняют друг друга и позволяют адекватно моделировать процессы нефтепереработки [19].

Ярко выраженное структурное разнообразие характеризует и группы веществ, объединенных по видам биологической активности (антиоксиданты, канцерогены, пестициды, антибиотики). Так, в группу биоантиоксидантов входят и полифенолы, и ферменты, и витамины, и даже некоторые неорганические вещества [6]. **Узкие группы совместно определяемых веществ следует формировать, учитывая как сходство по свойствам веществ и способу их применения, так и структурное сходство молекул.** Примером могут быть группы фенольных антиоксидантов, фосфорорганических пестицидов или анионных поверхностно-активных веществ.

Объединению веществ в единую группу типа (б) способствует также их совместное присутствие в одних и тех же объектах анализа. Однако последний фактор не может быть самостоятельным классификационным признаком, так как нередко сопутствуют друг другу вещества, абсолютно несходные во всех остальных отношениях.

Естественно, состав группы однотипных веществ должны определять не аналитики, а те специалисты, которые будут использовать результаты анализа. Именно такие специалисты (технологи, экологи, медики) должны указать классификационные

признаки, а также количественные критерии отнесения веществ к той или иной группе. Так, для отнесения углеводородов к бензиновой фракции надо заранее установить интервал температур кипения ее компонентов. Это должны делать технологи, специалисты по нефтепереработке. Они же должны конкретизировать химико-аналитическую задачу, т. е. заранее указать, требуется ли раздельное определение компонентов бензина, или достаточно установить их суммарное содержание в исследуемом нефтепродукте. Задачи аналитика иные – создать надежную методику оценки суммарного (или раздельного) содержания аналитов данной группы, а затем обеспечить правильность и прецизионность результатов анализа.

в) Сходство химико-аналитических свойств. По-видимому, впервые этот способ классификации применил К.Р. Фрезениус в середине XIX в. для качественного анализа неорганических веществ. Использовать другие способы тогда было невозможно – структура атомов и молекул была неизвестна, свойства и способы применения веществ – слабо изучены. Поэтому Фрезениус выделял группы элементов по эмпирическому признаку – по возможности количественного осаждения этих элементов заранее выбранными групповыми реагентами, например в виде малорастворимых сульфидов. Такая схема обеспечила и четкое разделение, и достоверное обнаружение элементов [20].

Современная химия имеет совершенно другие, гораздо большие возможности, однако формирование групп веществ по эмпирически выбранным химико-аналитическим признакам нередко используют и сегодня. Такой подход весьма удобен для разработчиков методик анализа, но получаемая в этом случае информация о содержании отдельных групп веществ с трудом интерпретируется и не всегда устраивает тех, кто пользуется результатами выполненных анализов (далее – «заказчиков»). Примером может быть принятая в 1968 г. дефиниция аналитической группы «нефтепродукты» (применительно к гидрохимическому анализу этот термин имеет совершенно иной смысл, чем в быту или в химической технологии).

К группе нефтепродуктов решено было относить любые соединения, экстрагируемые из природной или сточной воды *n*-гексаном и не сорбируемые при последующем пропускании экстракта через слой оксида алюминия [21]. Естественно, в группу «нефтепродукты» попадут прежде всего углеводороды, но в нее войдут и некоторые неуглеводородные соединения. Эта группа включает как вещества природного происхождения, так и вещества, сбрасываемые в водоемы в составе промышленных стоков. Более того, группа «нефтепродукты» содержит как особо опасные экотоксиканты, так и сравнительно безвредные вещества. Суммарное содержание «нефтепродуктов» довольно легко измерить, но по данным о содержании «нефтепродуктов» трудно контролировать качество питьевой воды или судить об уровне техногенного загрязнения водоемов. Для обоснованных выводов требуется дополнительная информация о составе «нефтепродуктов».

В отличие от групп, выделенных по признакам (а) или (б), группы веществ, объединенных только по химико-аналитическим свойствам, имеют неустойчивый состав. В данном случае речь идет не об изменении состава группы во времени, а о том, что состав группы, формируемой по способу (в), непредсказуемо меняется при изменении условий анализа (например, при переходе к другой величине рН или к другой длине волны), а тем более при переходе к другому аналитическому реагенту (экстрагенту, сорбенту, осадителю). Суммарные содержания аналитов заданного типа, найденные по разным стандартным методикам, оказываются не только разными, но и несопоставимыми, что противоречит принципу единства измерений. Так, по данным И.А. Немировской, значения показателя «нефтепродукты», найденного для одних и тех же проб воды с использованием ИК-спектрометрии и флуориметрии, различаются более чем в 20 раз [22]. Причины расхождений рассмотрены в других главах, но очень часто при переходе к другому методу определяется другой набор веществ. Соответствующие показатели состава англоязычные авторы иногда называют «метод-зависимыми» (*method-dependent indices*).

Проблемы, возникающие при формировании групп по чисто аналитическим признакам, без учета структурных факторов, – проявляются и при определении фенолов в водах. Обычно для этого используют интегральный показатель «фенольный индекс». В описаниях соответствующих методик указывается, что ФИ характеризует суммарное содержание летучих фенолов, выраженное в пересчете на C_6H_5OH . На деле же ФИ характеризует суммарное содержание веществ, реагирующих с 4-аминоантипирином [23]. Некоторые фенолы (например, *n*-крезол) с этим веществом не реагируют, т. е. результат анализа их содержание не учитывает. Зато свой вклад в величину ФИ вносят некоторые нефенольные соединения, с которыми реагирует 4-аминоантипирин [24]. Очевидно, ФИ может быть и намного больше, и намного меньше действительного значения c_{Σ} [25], резко отличаясь от значения c_{Σ} , найденного методами ГЖХ или ВЭЖХ [26]. Кроме того, в группе веществ, характеризующихся с помощью ФИ, содержатся вещества, у которых значения ПДК различаются в тысячи раз. Это еще более затрудняет оценку качества воды.

Логично составлять группы так, чтобы входящие в них вещества не только имели сходные аналитические свойства, но и обладали сходной структурой и близкими «потребительскими» свойствами. Конечно, добиться этого очень трудно. Тем не менее формировать группы надо, учитывая не столько аналитические свойства веществ, сколько структуру их молекул и «потребительские» свойства, т. е. признаки типа (а) и/или (б). Следовательно, **методики пробоподготовки и способы измерения аналитических сигналов надо разрабатывать для групп заранее установленного состава, с учетом структурного сходства и/или сходства «потребительских» свойств компонентов.** В этом случае разработанные методики приведут к результатам анализов, отвечающим действительному значению c_{Σ} . Формирование групп с заранее известным составом, не зависящим от способа определения c_{Σ} , не только облегчит интерпретацию результатов анализа, но и позволит вводить объективные нормативы суммарных содержаний.

В отличие от ПДК индивидуальных веществ, введение нормативов для обобщенных показателей вызывает критику специалистов [11; 27; 28]. Отмечается, что значения ПДК смесей медики устанавливают без учета синергизма компонентов, способа измерения c_x и соотношения концентраций компонентов смеси. Очевидно, здесь нужны новые подходы.

1.2. Группы однотипных веществ

Многолетняя реализация «структурного», «потребительского» и «аналитического» подходов к отбору совместно определяемых аналитов привела к формированию множества групп разного типа и разного уровня. Группы и соответствующие им интегральные показатели состава сложились еще в 1930–1950-х гг. [28]. К настоящему времени каждый тип объектов анализа характеризуется своим традиционным набором групп совместно определяемых веществ (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Группы совместно определяемых веществ

<i>Объект</i>	<i>Основные группы</i>
Природные и сточные воды	Органические вещества, взвешенные вещества, нефтепродукты (углеводороды), фенолы, поверхностно-активные вещества (КПАВ, АПАВ, НПАВ), кислоты, гуминовые кислоты и др.
Нефть и нефтепродукты	Алканы (парафины), циклоалканы (нафтенy), арены, полиарены, олефины, смолы, асфальтены, кислоты, серосодержащие соединения, показатели фракционного состава (бензин, керосин, мазут и т. п.) и др.
Пищевые продукты	Белки, жиры, углеводы, антиоксиданты, отдельные группы антиоксидантов, экстрактивные вещества, пестициды и др.
Биообъекты	Белки (суммарно), альбумины, глобулины, редуцирующие сахара, липиды, триглицериды, холестерин (суммарно), билирубин (суммарно) и др.

Естественно, в табл. 1.1 включены не все объекты анализа и далеко не все группы совместно определяемых аналитов. Набор и названия групп соответствуют отечественным традициям. За рубежом приняты несколько иные наборы групп. Так, в США и странах Евросоюза часто определяют группу органических веществ с условным названием *Oil and Grease* [29]. Кроме углеводов, она включает более широкий набор неуглеводородных веществ, чем привычная для отечественных аналитиков группа «нефтепродукты»; последней приблизительно соответствует американский показатель ТРН [3]. Разумеется, в любых объектах определяют не только группы однотипных аналитов и соответствующие им интегральные показатели, но и индивидуальные вещества. Кроме того, рассчитывают комбинаторные показатели (индекс загрязненности воды) и измеряют обобщенные свойства объекта (например, электропроводность, вязкость, величину рН). Тем не менее роль показателей группового состава весьма велика. Примером может быть анализ гидрохимических объектов (рис. 1.1).

1.3. Способы определения суммарного содержания однотипных веществ

Весьма распространенными способами определения c_{Σ} являются те, что основаны на хроматографическом разделении однотипных веществ (рис. 1.2, слева). Исследуемую пробу вводят в хроматограф, после выхода из колонки компоненты детектируют, опознают пики аналитов искомой группы, рассчитывают их концентрации (c_i) и суммируют их.

Примером может быть определение группового состава бензинов по стандартной методике [30]. Подобные методики широко применяют и в экологическом мониторинге [31], в анализе пищевых продуктов и в других случаях. В исследованиях состава пищевых продуктов и биообъектов для разделения компонентов и последующей оценки суммарных содержаний нередко используют капиллярный электрофорез [32]. Однако соответствующие

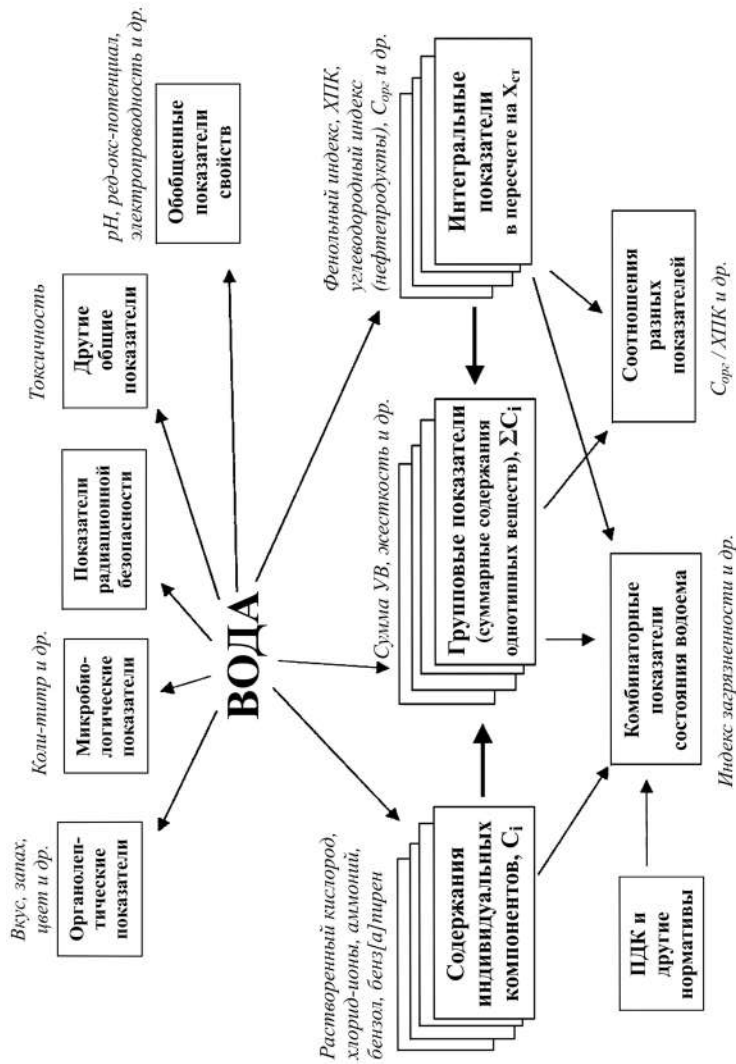


Рис. 1.1. Оценки суммарных содержаний однотипных веществ в системе показателей качества природных и сточных вод

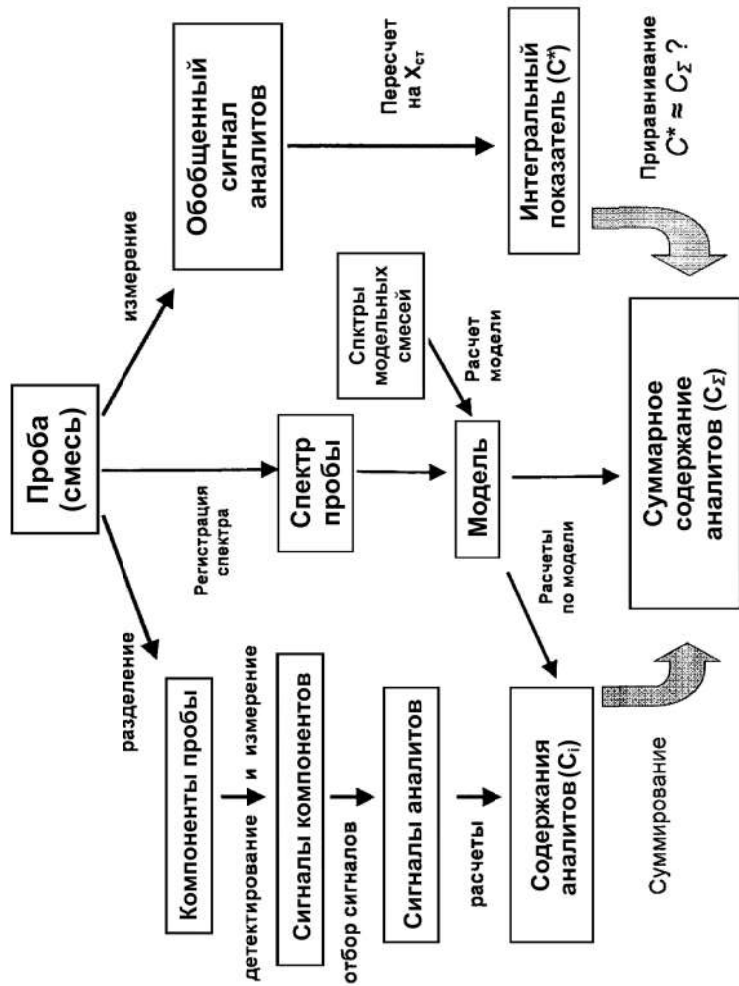


Рис. 1.2. Схемы оценки суммарного содержания аналитов: хроматографический анализ (слева); применение многомерных градиентов (в центре); пересчет на $X_{ст}$ (справа)

способы оценки c_{Σ} применимы далеко не во всех случаях. Разделение некоторых смесей в колонке или в капилляре может приводить к деструкции компонентов, сдвигу равновесий и другим нежелательным последствиям [33], а само разделение иногда идет слишком долго. Ложные идентификации, неизбежные при опознании веществ по временам удерживания [34], сильно искажают показатели группового состава [35], особенно в анализе объектов окружающей среды. Качественный состав этих объектов сложен и непредсказуем, вероятность идентификационных ошибок здесь особенно высока.

Во многих случаях раздельное определение однотипных аналитов дает избыточную (не нужную заказчику) информацию. Вероятно, хроматографические и подобные им методы, предполагающие разделение однотипных веществ, следует использовать преимущественно для определения индивидуальных соединений, а при определении суммарных содержаний – как арбитражные методы, для проверки правильности результатов анализа неразделенных смесей. Для массового определения суммарных содержаний лучше применять экспрессные методы, не требующие разделения однотипных веществ, в частности методы молекулярной спектроскопии [1]. Как показано в обзоре [36], с этой целью обычно используют методики трех типов:

- прямое определение c_{Σ} по методикам, одинаково чувствительным ко всем аналитам данной группы;
- расчет c_{Σ} с применением хемометрических алгоритмов и многомерных градуировок;
- приблизительная оценка c_{Σ} с помощью интегральных показателей, в пересчете на стандартное вещество – этот способ (рис. 1.2, справа) используется чаще, чем другие.

Охарактеризуем эти способы более детально.

1.3.1. Прямое определение c_{Σ}

Таких методик сравнительно немного. Они основаны на измерении обобщенного аналитического сигнала, возникающего в результате наложения сигналов всех веществ данной группы, присутствующих в исследуемой пробе. Естественно, посторонние соединения не должны влиять на обобщенный сигнал, либо должны быть заранее отделены или замаскированы. Сигналы аналитов должны быть аддитивными, т. е. аналиты не должны реагировать друг с другом (см. главу 4).

Хорошим примером является экстракционно-гравиметрическое определение суммы углеводов в сильно загрязненных водах [37]. Специально подобранный экстрагент обеспечивают одинаковую (близкую к 100 %) степень извлечения всех УВ, затем неуглеводородные компоненты экстракта отделяют на подходящем сорбенте, экстрагент осторожно удаляют, а оставшуюся смесь углеводов взвешивают. Используемый в данном случае детектор (весы) одинаково чувствителен к любым аналитам. Выполняется и условие аддитивности – в условиях анализа углеводороды не взаимодействуют, масса их смеси равна сумме масс компонентов.

Суммарное содержание УВ в экстракте из слабо загрязненной природной воды тоже можно определить без разделения смеси аналитов. В этом случае гравиметрический метод недостаточно чувствителен, и для определения c_{Σ} используют газовый хроматограф с пустой колонкой, в которой УВ не разделяются [38]. После ввода пробы, ее испарения и отделения неуглеводородных компонентов единый пик всех УВ регистрируется пламенно-ионизационным детектором, одинаково чувствительным ко всем УВ. Градуировку строят по стандартным водным растворам с известным суммарным содержанием УВ. Площадь пика прямо пропорциональна c_{Σ} .

Еще один пример – определение суммарного содержания изомеров туйона в алкогольных напитках. В ходе анализа измеряют площадь одного из пиков в спектре ЯМР, прямо пропорциональную суммарной концентрации всех изомеров. Проверка

подтвердила одинаковую чувствительность определения всех изомеров туйона и отсутствие влияния посторонних веществ, методика определения c_{Σ} дает правильные результаты [39].

К прямым методам можно отнести и титриметрическое определение c_{Σ} , если все компоненты группы реагируют с неселективным титрантом одинаковым образом, в соответствии с законом эквивалентов, а результат титрования выражают в моль-экв/дм³. Так определяют суммарное содержание кислот или непредельных соединений. Конечно, результат можно выразить и в пересчете на массу некоторого стандартного вещества, например в мг O₂/дм³, как при определении ХПК [40], но это будет уже метод иного типа. Определить суммарную массу оттитрованных органических соединений по расходу титранта или по величине ХПК не удастся, так как компоненты смеси имеют разные эквиваленты, а состав смеси, как правило, неизвестен. Недостатком титриметрии как метода прямого определения суммарных содержаний является и низкая чувствительность.

Несмотря на периодическое появление новых методик прямого определения c_{Σ} , с их помощью вряд ли удастся решить проблему точной оценки суммарных содержаний. Одновременное выполнение ряда трудновыполнимых условий (наложение сигналов, одинаковая чувствительность детектирования компонентов, аддитивность обобщенного сигнала, отсутствие влияния посторонних веществ) представляется маловероятным событием.

1.3.2. Косвенные методы

В методиках этого типа (рис. 1.2, в центре) обычно используют спектр неразделенной смеси аналитов или продуктов их превращений. Как и в предыдущем случае, сигналы разных аналитов накладываются друг на друга. Однако чувствительность определения разных аналитов различается, что не позволяет рассчитать их суммарное содержание или концентрации индивидуальных веществ по результату единичного измерения. Однако значения c_i можно найти, измеряя обобщенные сигналы в разных условиях,

например при разных аналитических длинах волн. Число АДВ должно быть больше числа компонентов группы, присутствующих в данной пробе (переопределенная система). Заранее строят многомерную градуировку (математическую модель), обрабатывая спектры ряда модельных смесей известного состава (обучающая выборка). Для построения модели и последующих вычислений используют хемометрические алгоритмы, например метод проекции на латентные структуры. С помощью полученной градуировки по спектру пробы рассчитывают все c_i и суммируют их. В частности, таким способом по спектру поглощения смеси полифенолов в УФ-области определяли суммарное содержание этих полифенолов [41]. Результаты анализа модельных пятикомпонентных смесей оказались хорошо воспроизводимыми, а систематические погрешности оценки суммарных содержаний (на уровне 50–100 мкМ) не превышали 5 % отн.

В тех случаях, когда сигналы однотипных аналитов не накладываются друг на друга, а регистрируются порознь, значения c_i можно найти с помощью серии одномерных градуировок, а затем просуммировать. Разная чувствительность определения аналитов в данном случае не помешает. Примером подобных методик может быть ЯМР-спектрометрическое определение суммарного содержания жирных кислот [42].

Рассчитывать значения c_Σ можно и без промежуточного вычисления c_i . Для этого в обучающую выборку включают спектры ряда природных или техногенных смесей, состав которых аналогичен исследуемым пробам, а значения c_Σ этих смесей заранее найдены надежным независимым методом. Затем рассчитывают многомерную градуировку, связывающую значения оптической плотности смесей при разных АДВ и суммарные содержания аналитов в этих смесях. Пользуясь такой градуировкой, по спектру пробы рассчитывают величину c_Σ . Данный подход реализован при определении суммы фенольных соединений в зеленом чае [13], суммы танинов в красных винах [43], при определении группового состава бензинов [44] и во многих других случаях. Кроме спектро-

метрических методов, тот же подход в принципе применим и при использовании других инструментальных методов, например вольтамперометрии, флуориметрии или потенциометрических мультисенсорных систем типа «электронный язык». Однако главные достижения в этой области связаны с применением спектрометрических методов (см. разделы 6.1 и 6.2).

Методики, основанные на применении многомерных градуировок, дают весьма точные результаты. Так, методика [44], основанная на регистрации спектров поглощения бензинов в ближней ИК-области, позволяет определять суммарные содержания алканов, циклоалканов и аренов почти с той же точностью, что и стандартная методика ГЖХ-анализа бензинов [30], но «хеометрический» анализ в 20 раз быстрее. Методики, основанные на регистрации БИК-спектров и использовании многомерных градуировок, широко применяют на фармацевтических и нефтеперерабатывающих предприятиях.

Косвенные способы определения c_{Σ} по многомерным градуировкам применимы далеко не всегда. Мешает необходимость заранее знать (хотя бы приблизительно) качественный состав проб, что нужно для построения адекватных градуировок. Появление в пробе хотя бы одного компонента группы, не учтенного при построении градуировки, ведет к систематическим погрешностям [41]. Есть и другие проблемы: трудно предсказуемое влияние посторонних веществ, нередкая неаддитивность обобщенного сигнала, отсутствие надежных референтных методик, трудоемкость построения многомерных градуировок, неготовность ряда аналитиков применять хеометрические алгоритмы.

1.3.3. Оценка суммарного содержания аналитов в пересчете на $X_{\text{ст}}$

Измерив обобщенный аналитический сигнал, можно найти суммарное содержание однотипных аналитов в пересчете на стандартное вещество, т. е. выразить его в виде интегрального показателя. Дефиниция ИП будет дана в главе 2, там же будут рассмот-

рены их виды и метрологические особенности. Но уже сейчас следует указать, что оценка c_{Σ} с помощью ИП – самый распространенный и доступный способ оценки суммарного содержания однотипных веществ, не требующий разделения этих веществ [2]. Очень важно, что для определения ИП не нужно заранее выяснять качественный состав смеси аналитов, присутствующих в пробе. Соответствующие методики анализа довольно просты и хорошо воспроизводимы; результаты анализа позволяют быстро охарактеризовать объект, сопоставить однотипные объекты и провести скрининг.

В ходе анализа измеряют обобщенный сигнал всех аналитов, присутствующих в данной пробе (A_{Σ}). По растворам стандартного вещества $X_{\text{ст}}$ строят одномерную градуировочную зависимость вида $A_{\Sigma} = k C_{X_{\text{ст}}}$, которую и используют для расчета ИП:

$$c^* = A_{\Sigma} / K_{\text{ст}}, \quad (1.1)$$

где $K_{\text{ст}}$ – коэффициент чувствительности для $X_{\text{ст}}$; c^* – числовое значение ИП, которое считают равным искомому значению c_{Σ} .

Примером может быть расчет фенольного индекса сточной воды или показателя «общий белок» в клиническом анализе. Интегральные показатели можно определять любым методом – электрохимическим, титриметрическим и даже хроматографическим (в этом случае A_{Σ} – суммарная площадь пиков на хроматограмме). Однако чаще всего для определения ИП измеряют оптическую плотность пробы в УФ, ИК или видимой области. Известно несколько десятков таких ИП (рис. 1.3).

Система пересчетных интегральных показателей доказала свою полезность. Целесообразность дальнейшего применения этой системы не вызывает сомнений, как бы ни совершенствовались методы раздельного определения однотипных веществ. Вместе с тем измерение c_{Σ} в пересчете на стандартное вещество не вполне корректно в метрологическом отношении (см. раздел 2.2), система ИП не была теоретически обоснована, а результаты определения многих ИП сильно отличаются от соответствующих c_{Σ} , нередко в несколько раз. Низкая точность определения ИП может

приводить к неверным техническим, диагностическим и природоохранным решениям. Эти обстоятельства требуют детального рассмотрения всех аспектов применения ИП (глава 2), изучения причин появления систематических погрешностей (главы 3 и 4) и разработки особых способов повышения правильности анализа (главы 5 и 6).



Рис. 1.3. Примеры интегральных показателей, определяемых спектрометрическим методом в УФ-, ИК- и видимой (Вид) областях спектра

1.4. Способы измерения обобщенных аналитических сигналов

Аналитические сигналы однотипных компонентов неразделенной смеси могут быть измерены самыми разными методами, но не все они подходят для оценки суммарных содержаний. Требования к методам измерения обобщенных сигналов во многом отличны от требований, сформированных для методов измерения

сигнала единичного аналита при раздельном определении ряда однотипных веществ, а именно:

- **Необходимо, чтобы обобщенный аналитический сигнал создавался всеми компонентами данной группы. Селективность сигналов не только не нужна, но и сильно мешает точной оценке c_{Σ}** , что непривычно для аналитиков. Именно поэтому для определения суммарного содержания однотипных веществ редко применяют наиболее «модные» и селективные методы – атомно-эмиссионный и атомно-абсорбционный анализ, ферментативные методы, масс-спектрометрию, ЯМР-спектрометрию, рентгенофазовый анализ. Но надо учесть, что точной оценке c_{Σ} мешает лишь *внутригрупповая* селективность. Напротив, *межгрупповая* селективность весьма желательна. Если вещества, не входящие в данную группу, не будут влиять на обобщенный сигнал аналитов, не потребуется и отделять их перед измерением этого сигнала.

- Для правильной оценки c_{Σ} очень важна аддитивность аналитических сигналов. Статистически значимые отклонения от аддитивности должны быть заранее выявлены, а затем устранены (изменение способа формирования или условий измерения сигналов). Альтернатива – переход к способам расчета, мало чувствительным к отклонениям от аддитивности. Например, к использованию многомерных градуировок, построенных по модельным смесям известного состава, аналогичным составу исследуемых проб.

- Желательна одинаковая чувствительность определения всех компонентов группы. Это очень важно для точной оценки суммарных содержаний с помощью ИП.

- Поскольку методики оценки суммарных содержаний предназначены в первую очередь для массового и упрощенного аналитического контроля, а также для скрининга – желательно использование несложной и недорогой аппаратуры. Как и при определении индивидуальных веществ, желательны высокая чувствительность, прецизионность измерений и возможность их автоматизации. Уже созданы специальные приборы, с помощью которых можно быстро измерять интегральные показатели вне лаборатории. Пример –

полностью автоматизированные приборы серии Rancimat для оценки суммарного содержания антиоксидантных присадок в маслах.

С учетом изложенных требований становится понятным, почему основным способом оценки c_{Σ} стала молекулярная спектрометрия. Причем с этой целью используют не столько классические измерения оптической плотности в видимой области, сколько УФ- и ИК-спектрометрию. Реже используют флуориметрию (из-за низкой воспроизводимости) и рефрактометрию (из-за низкой чувствительности). Используют также кондуктометрию, амперометрию и другие электрохимические методы, а также классические методы титриметрии и гравиметрии. Примеры и области применения разных методов приведены в табл. 1.2.

Таблица 1.2

**Применение разных методов анализа
для оценки суммарного содержания однотипных аналитов**

<i>Метод</i>	<i>Объект анализа</i>	<i>Группа аналитов или интегральный показатель</i>
Гравиметрия	Природные и сточные воды	Углеводороды (нефтепродукты), взвешенные вещества, смолы, минерализация и др.
	Нефтепродукты	Показатели фракционного состава, смолы, асфальтены
Титриметрия	Природные и сточные воды	Кислоты, соли (жесткость), органические вещества (ХПК, БПК), фенолы
	Нефть и нефтепродукты	Непредельные углеводороды, галогенпроизводные, сульфиды
	Пищевые продукты	Кислоты, хлориды, пероксиды, редуцирующие сахара
	Биообъекты	Белки, соли
Электрохимические методы	Природные и сточные воды	Сильные электролиты (соленость), тяжелые металлы
	Пищевые продукты	Антиоксиданты (восстановители), редуцирующие сахара, тиолы

Окончание табл. 1.2

<i>Метод</i>	<i>Объект анализа</i>	<i>Группа аналитов или интегральный показатель</i>
Рефрактометрия	Пищевые продукты	Углеводы, жиры, продукты окисления жиров, экстрактивные вещества
ИК-спектрометрия	Природные и сточные воды	Углеводороды (нефтепродукты), арены, $C_{орг}$
	Нефть и нефтепродукты	Показатели группового состава (алканы, циклоалканы, арены), сульфиды, кислородсодержащие вещества, азотсодержащие вещества и др.
	Пищевые продукты	Белки, токоферолы, каротины
Спектрометрия в видимой и УФ-области	Природные и сточные воды	Фенолы, амины, углеводороды (нефтепродукты), арены, гликоли, хиноны, фурфурол и гомологи, поверхностно-активные вещества, ксантогенаты, гуминовые кислоты, пиридиновые основания и др.
	Нефть и нефтепродукты	Арены, полиарены, сульфиды
	Пищевые продукты	Антиоксиданты (антиоксидантная активность), отдельные группы антиоксидантов, белки, жиры, редуцирующие сахара и др.
	Биообъекты	Белки, нуклеиновые кислоты, общий холестерин, общий билирубин и др.

Очень важное место среди других методов измерения обобщенных аналитических сигналов заняли методы, основанные на сжигании пробы и последующем детектировании одного из продуктов. Для оценки суммарного содержания органических веществ в малозагрязненных водах традиционно используют показатель ТОС (общий органический углерод), выражая его

в мг С/дм³. Определение ТОС основано на высокотемпературном окислении пробы с последующим ИК-спектрометрическим или кондуктометрическим детектированием образующегося СО₂. В последние годы метод был существенно усовершенствован (см. обзор [45]), что позволило наладить массовый выпуск разнообразных ТОС-анализаторов, в том числе автоматизированных. Проверка показала, что в таких анализаторах почти все органические соединения полностью превращаются в СО₂. Неполная конверсия характерна лишь для некоторых соединений, отсутствующих в природных и сточных водах (кофеин) или присутствующих в качестве микропримесей, минорных компонентов соответствующих смесей (*m*-крезол) [46]. Широкое распространение ТОС-анализаторов снизило интерес к таким интегральным показателям, как ХПК и БПК.

Постоянно появляются новые способы измерения обобщенных аналитических сигналов. Успехи преимущественно связаны с определением суммарного содержания органических веществ в водах и суммы антиоксидантов в пищевых продуктах.

В качестве примеров рассмотрим три новых способа измерений обобщенных сигналов:

1. Недавно Б.К. Зуев разработал новый способ оценки суммарного содержания органических веществ («окситермография») и предложил определять этим способом новый интегральный ИП «термическое потребление кислорода». Метод окситермографии основан на высокотемпературном окислении органических веществ кислородсодержащей газовой смесью [47]. Количество кислорода, потраченного на окисление, измеряется твердоэлектродной ячейкой, работающей в кулонометрическом режиме. Градуировку приборов ведут по растворам индивидуальных органических соединений. Новый интегральный показатель во многих отношениях близок к показателю ХПК, но его измерение не требует химических реактивов и специальных стандартных образцов. При этом чувствительность определения разных органических соединений очень близка, что и обеспечивает независимость ре-

зультатов анализа от качественного состава пробы. Метод применен для анализа природных и сточных вод [48], причем объем анализируемой воды – от 1 до 10 мкл, время анализа – 3–5 мин, относительное стандартное отклонение не превышает 0,15. Предел обнаружения органических веществ в воде, выраженный в пересчете на O_2 , составляет 5 мг/дм^3 . Тот же метод применен для определения нефтепродуктов, находящихся в виде пленок на поверхности воды [49], для определения гумуса в почвах и даже для оценки жирности кожи.

2. В результате систематического изучения процесса электровосстановления растворенного кислорода в присутствии антиоксидантов [50], Е.И. Короткова и соавторы предложили новый способ измерения сигнала антиоксидантов и новый ИП, позволяющий оценить вольтамперометрическим методом суммарное содержание антиоксидантов в пересчете на аскорбиновую кислоту [51; 52]. В интервале 0,1–1,0 мг/мл относительная погрешность оценки c_{Σ} не превышает 23 %. Метод использован для анализа пищевых добавок, лекарственных препаратов, косметической продукции, а также в клиническом анализе.

3. Простой и экспрессный потенциометрический метод измерения суммарной антиоксидантной активности предложен Х.З. Брайниной и соавторами [53]. Он основан на изменении потенциала Pt-электрода в присутствии медиаторной системы $Fe(III)/Fe(II)$ после добавления пробы, содержащей смесь восстановителей (антиоксидантов ЕТ-типа). Результат анализа выражают в ммоль-экв/дм³, не пересчитывая сигнал на заранее выбранное стандартное вещество. Методики метрологически аттестованы и применены для оценки состава пищевых продуктов, лекарственных препаратов, а в последние годы – и для анализа биообъектов.

1.5. Особенности некоторых групп однотипных веществ

Рассмотрим особенности состава, свойств и способов определения суммарного содержания однотипных веществ на примере трех групп – углеводов, фенолов и антиоксидантов. Суммарные содержания этих веществ определяют гораздо чаще, чем суммарные содержания многих других аналитов. Столь же часто определяют разве что суммарное содержание всех органических веществ ($C_{орг}$, ХПК, БПК) и суммарное содержание белков.

При определении углеводов, фенолов и антиоксидантов используют разные подходы к оценке суммарного содержания однотипных веществ, разные способы измерения сигналов, даже разные способы расчета результатов анализа. Однако анализ литературы показывает, что в каждом случае возникают одни и те же методические проблемы, которые пока что далеки от решения. В наших исследованиях именно эти группы однотипных веществ были использованы в качестве модельных объектов, поэтому стоит рассмотреть их основные характеристики и традиционные способы определения C_{Σ} .

1.5.1. Углеводы в составе природных и сточных вод¹

Смеси углеводов (УВ), содержащиеся в природных и сточных водах, состоят, главным образом, из алканов (н-парафинов и изопарафинов), циклоалканов (нафтен) и ароматических УВ (аренов). Наиболее выражено присутствие УВ, содержащих от 6 до 30 атомов углерода [54; 55]. Таким образом, структурная группа «углеводы» включает около сотни индивидуальных веществ. Определение индивидуальных УВ в природных и сточных водах не представляет особого интереса (за исключением особо токсичного бензола и особо канцерогенного бенз[а]пирена). Важно оценить суммарное содержание всех УВ

¹ Подраздел подготовлен при участии М.А. Федоровой.

и, в меньшей степени, содержания более узких углеводородных групп, например полиаренов.

Суммарное содержание УВ в природных водах обычно не превышает 1 мг/дм^3 . Основным источником углеводородного загрязнения водоемов являются стоки промышленных предприятий. Наиболее загрязнены углеводородами стоки предприятий нефтедобывающей, нефтеперерабатывающей, химической, металлургической и некоторых других отраслей промышленности. Кроме того, УВ могут попадать в воду в результате аварий трубопроводов и нефтеналивных судов, аварий и пожаров на нефтехранилищах и нефтеперегонных заводах, а также с хозяйственно-бытовыми сточными водами. Еще один источник загрязнения водоемов – утечка нефти и нефтепродуктов из подземных хранилищ.

Набор УВ в природной воде сильно зависит от источника ее загрязнения и постепенно меняется; после попадания смеси УВ в воду под действием микроорганизмов, света и растворенного кислорода начинают идти медленные и довольно избирательные процессы деградации углеводородных смесей, одновременно идут процессы испарения легких УВ, окисления непредельных УВ, сорбции тяжелых УВ. Из обычных УВ могут образоваться более тяжелые и более токсичные соединения, обладающие канцерогенными и мутагенными свойствами. Углеводороды и продукты их последующей трансформации довольно устойчивы к микробиологическому расщеплению. Самоочистка водоемов идет очень медленно, возможно постепенное накопление УВ, особенно в донных отложениях.

Попадая в воду, УВ делают ее непригодной для питья, наносят вред здоровью людей и обитателей водоемов, могут оказывать наркотическое действие и вызывать отравления. Наибольшую токсичность проявляют легкие арены, наиболее опасными канцерогенами являются полиарены. Попадание УВ в водоемы нарушает ход естественных биохимических процессов, разрушает биоценозы, вызывает необратимые изменения природной среды. Поэтому определение суммарного содержания УВ в водах считают

одним из важнейших видов химического анализа. Следует выделить методические работы Р.Г. Симарда, А.Д. Семенова, Ю.С. Другова, А.А. Кленкина, Л.Ф. Павленко, Р.Р. Шагидуллина и некоторых других авторов (см. обзоры [3; 55–59]).

Как правило, в ходе анализа сумму УВ выделяют из воды экстракционным (реже сорбционным) методом. Вместе с углеводородами из вод экстрагируются другие органические вещества – азот-, серо- и кислородсодержащие соединения, в том числе несвязанные с техногенным загрязнением окружающей среды. Формируемую по чисто аналитическому признаку «экстрагируемость» широкую группу веществ, включающую все УВ, а также ряд неуглеводородных соединений, принято называть «нефтепродуктами» или «аквабитумоидом». Структурная группа «углеводороды» является лишь частью этой группы. Доля УВ в аквабитумоидах обычно превышает 90 %, но по данным С.Г. Орадовского, варьирует в более широких пределах – от 50 до 98 % [60].

Суммарное содержание УВ в сточных водах колеблется от полного отсутствия до 1–2 г/дм³. Нередко сточные воды содержат УВ на уровне, значительно превышающем их равновесную растворимость. Это объясняется возможностью образования устойчивых эмульсий, а также возможностью сорбции УВ на взвешенных частицах.

Поскольку многие УВ токсичны, суммарное содержание УВ в водах тщательно контролируют. Показатель c_{Σ} иногда определяют экстракционно-хроматографическим методом, предполагающим полное разделение смеси индивидуальных УВ и суммирование найденных концентраций [3; 30; 61]. Этот способ широко используют в странах Евросоюза и в США. В России суммарное содержание УВ в водах хроматографическими методами определяют довольно редко, хотя утверждены соответствующие ГОСТы. Вместо ГЖХ используют спектрометрические методы, определяя интегральный показатель «нефтепродукты», который является приблизительной оценкой суммарного содержания углеводородов. Показатель выражают в пересчете на некоторое стандартное ве-

шество (смесь Симарда, смесь ГОИН и др.). Поскольку загрязнение вод углеводородами далеко не всегда связано с попаданием в водоем *нефтепродуктов* в общепринятом смысле этого слова, в англоязычной научной литературе используют более точные термины *hydrocarbon index*, *total petroleum hydrocarbons* и другие [2; 3; 55]. Термин «углеводородный индекс» с недавних пор стали использовать и в отечественной литературе.

Найденные значения показателя «нефтепродукты» сравнивают с официально установленными нормативами. Для водных объектов рыбохозяйственного назначения предельно допустимое значение этого показателя составляет $0,05 \text{ мг/дм}^3$. Для питьевой воды – $0,1 \text{ мг/дм}^3$, для сточных вод – 4 мг/дм^3 , для ливневых стоков – $0,05 \text{ мг/дм}^3$ [57]. Методы контроля загрязненности гидрохимических объектов нефтепродуктами обсуждаются во многих статьях и книгах, начиная с классических руководств, составленных под руководством Ю.Ю. Лурье. Можно выделить два типа методик. К первому отнесем методики определения суммы УВ, основанные на применении гравиметрии и хроматографии, без пересчета на стандартное вещество. Ко второму – методики, в которых показатель «нефтепродукты» определяют в пересчете на стандартное вещество. Наиболее распространены методики второго типа, основанные на измерении обобщенного сигнала углеводородов методами ИК-спектromетрии (рис. 1.4).

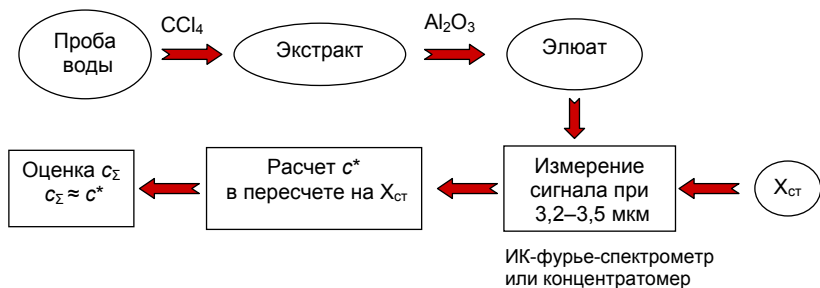


Рис. 1.4. Схема ИК-спектрометрического определения суммарного содержания углеводородов в природных и сточных водах по одномерной градуировке

В тех же целях применяют флуориметрию и УФ-спектрометрию. Флуориметрию используют для контроля качества питьевой воды, где углеводов очень мало. По данным А.А. Кленкина [12], стандартные методики УФ спектрометрического и флуориметрического определения показателя «нефтепродукты» дают погрешности, доходящие до 300–500 %. Лучшие ИК-спектрометрические методики характеризуются погрешностями порядка 30–50 % отн. Это не соответствует требованиям действующего ГОСТа [62].

Для определения суммарного содержания УВ в водах не хватает точных, экспрессных и чувствительных методик, не требующих пересчета обобщенного сигнала на стандартное вещество. Соответствующие методики могли бы существенно дополнить набор известных способов определения показателя «нефтепродукты». Да и сам этот показатель требуется определять с гораздо большей точностью.

1.5.2. Фенолы в составе природных и сточных вод²

К этой группе относят свыше 30 индивидуальных соединений, в том числе простейший фенол, крезолы, ксиленолы, хлорфенолы, гваякол, производные лигнина и другие фенольные соединения, а также некоторые их производные (нитрофенолы). Фенолы поступают в водоемы в составе сточных вод предприятий нефтеперерабатывающего, лесохимического, коксохимического, анилиноокрасочного, целлюлозно-бумажного и других производств. Основной вклад в фенольное загрязнение водоемов вносят сточные воды процессов термической переработки твердого топлива, переработки древесины, получения синтетических фенолов, фенолоформальдегидных смол и лакокрасочных материалов [63]. В сточных водах соответствующих предприятий суммарное содержание фенолов может превышать 10–20 г/л при самых разных сочетаниях индивидуальных веществ, отражающих

² Подраздел подготовлен при участии Т.В. Антоновой.

специфику предприятия. Так, в фенольных смесях, содержащихся в стоках нефтеперерабатывающих предприятий, обычно доминируют фенол и крезолы, а в стоках целлюлозно-бумажных комбинатов – гваякол и родственные ему соединения.

Токсичность разных фенолов весьма различна. Значения ПДК_в 2,4,6-трихлорфенола – 0,4, фенола – 1, *о*-крезола – 50, а ксиленолов – 250 мкг/дм³ [64]. Тем не менее содержания индивидуальных фенолов в водах редко определяют порознь, как правило, оценивают лишь их суммарное содержание (в мг/л). Следует отметить, что опасность фенольного загрязнения водоемов не ограничивается собственно фенолами. В процессе обеззараживания хлором фенолсодержащих вод образуются хлорфенолы, способные в некоторых условиях превращаться в чрезвычайно токсичные полихлорированные дибензо-*п*-диоксины (диоксины) и дибензофураны [16]. Значения ПДК диоксинов в 10⁵–10⁶ раз ниже, чем ПДК фенолов и хлорфенолов.

При проведении массовых анализов фенолы из водной фазы традиционно выделяют методом отгонки с водяным паром. Летучие с паром фенолы (фенол, крезолы, ксиленолы, гваякол, тимол и др.) более токсичны, чем нелетучие. Другие фенолы (резорцин, пирокатехин, гидрохинон, пирогаллол, нафтолы и многоатомные фенолы) частично или полностью остаются в отгоне. Из-за разной токсичности и нечеткого разделения летучие и нелетучие фенолы часто определяют порознь. Концентрирование фенолов или их дериватов проводят также экстракционными и сорбционными методами.

Кроме фенолов техногенного происхождения, в природных водах присутствуют низкомолекулярные фенолы, образующиеся при биохимическом распаде и трансформации органических веществ (высокомолекулярных гуминовых и фульвокислот), а также в результате метаболизма водных организмов, что является причиной возникновения фона, значительно большего, чем для других токсикантов. Превышение естественного фона служит индикатором антропогенного загрязнения водоемов.

Определение фенолов в водах является актуальной задачей гидрохимического анализа, сложность решения которой обусловлена многообразием и различием свойств фенолов, низкими значениями их ПДК, высокой растворимостью в воде, способностью к окислению и к последующей деградации в водоемах, а также при хранении проб. Способы измерения обобщенного аналитического сигнала фенолов рассмотрены в обзорах [58; 63; 64]. Чаще всего используют реакции превращения фенолов в интенсивно поглощающие хинониминовые красители, а также реакции диазотирования и азосочетания, ведущие к образованию азокрасителей [24]. Кроме того, сумму фенолов можно определять электрохимическими методами, а также методами УФ- и ИК-спектроскопии. Основным способом определения суммарного содержания фенолов в водах является измерение фенольного индекса после проведения реакции с 4-аминоантипирином. Недостатки этого варианта анализа недавно выявлены тремя группами российских исследователей [25–27]. Независимо друг от друга они показали, что использование ФИ, как правило, ведет к недооценке фенольного загрязнения водоемов. Это объясняется как инертностью ряда фенолов в реакции с 4-аминоантипирином, так и низкой чувствительностью определения замещенных и бициклических фенолов по сравнению с определением стандартного вещества (простейшего фенола). В отдельных случаях межгрупповая неселективность указанной реакции может приводить и к завышенным оценкам фенольного загрязнения. Давно назрела необходимость замены фенольного индекса другим интегральным показателем, который бы одинаково хорошо «чувствовал» любые фенолы и обеспечивал правильную оценку их суммарного содержания. Цель достижима, если использовать другие фотометрические реагенты [65; 66].

1.5.3. Антиоксиданты в составе пищевых продуктов³

К обширной группе антиоксидантов (АО) относят несколько сотен веществ различной химической природы. Антиоксидантами называют соединения, в малых концентрациях тормозящие или предотвращающие окислительную деструкцию органических веществ в организме или в техническом объекте, независимо от механизма их действия. Окислителями обычно являются пероксидные радикалы и другие активные формы кислорода [6]. Классифицировать АО можно по нескольким независимым признакам. Наиболее важно разделение АО по способу применения. *Технические* АО (например, ионол) синтезируют, а затем вводят в состав промышленной продукции для продления срока ее пригодности. Поскольку при этом не возникает необходимость в оценке суммарного содержания однотипных веществ, технические антиоксиданты далее не рассматриваются. Соединения другой группы – *биоантиоксиданты* – являются природными веществами [67; 68]. Как правило, это фенольные соединения (в том числе флавоноиды, танины, фенолокислоты), а также некоторые тиолы, витамины, ферменты и другие соединения. Биоантиоксиданты подавляют свободнорадикальное окисление в живом организме и регулируют метаболические процессы. При этом в организме, как и в пищевых продуктах, одновременно действует множество АО, различных по структуре и свойствам. Поэтому важно определить суммарное содержание биоантиоксидантов. Кроме того, в обширной группе биоантиоксидантов можно выделить более узкие группы, причем для классификации используют несколько независимых критериев (табл. 1.3).

³ Подраздел подготовлен при участии Н.С. Бриленок.

Таблица 1.3

Классификации антиоксидантов

Классификационный критерий	Группы	
Способ использования	Технические АО	Биоантиоксиданты
Растворимость	Гидрофильные АО (водорастворимые)	Липофильные АО (жирорастворимые)
Условия проявления активности	АО прямого действия (активны <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>)	АО косвенного действия (активны только <i>in vivo</i>)
Направленность и механизм действия	НАТ-антиоксиданты (противорадикальные)	ЕТ-антиоксиданты (восстановители)
Химический состав и структура молекулы	Фенольные соединения (в том числе флавоноиды, танины, фенолокислоты), тиолы, витамины, ферменты и др.	

В конце XX в. было установлено, что свободные радикалы и другие активные формы кислорода играют важную роль в возникновении и развитии ряда опасных заболеваний, включая атеросклероз, рак, диабет, сердечно-сосудистые и неврологические заболевания. Считается, что свободные радикалы играют важную роль и в процессе старения, однако прямых доказательств этого нет. Интерес к биоантиоксидантам (далее приставка «био» не приводится) вызван естественными ожиданиями, что дополнительное введение этих веществ в организм будет снижать воздействие свободных радикалов в условиях *in vivo* и предотвращать перечисленные заболевания [68]. Уже опубликованы тысячи статей и книг по химии антиоксидантов, прошел даже всемирный конгресс исследователей в этой области (2004), но явно необходимы дальнейшие, в том числе химико-аналитические исследования.

Основным источником попадания АО в организм являются пищевые продукты, где одновременно содержатся десятки АО. На основании выполненных анализов составлены многочисленные таблицы по суммарному содержанию АО в разных продуктах,

наиболее обширная и надежная информация приведена в работе [69]. Особенно высоко содержание антиоксидантов в красном сухом вине, некоторых фруктах, соках, чае и кофе. Лучше всего изучены присутствующие в этих продуктах водорастворимые антиоксиданты фенольного (точнее, полифенольного) типа (рис. 1.5), являющиеся активными восстановителями [70].

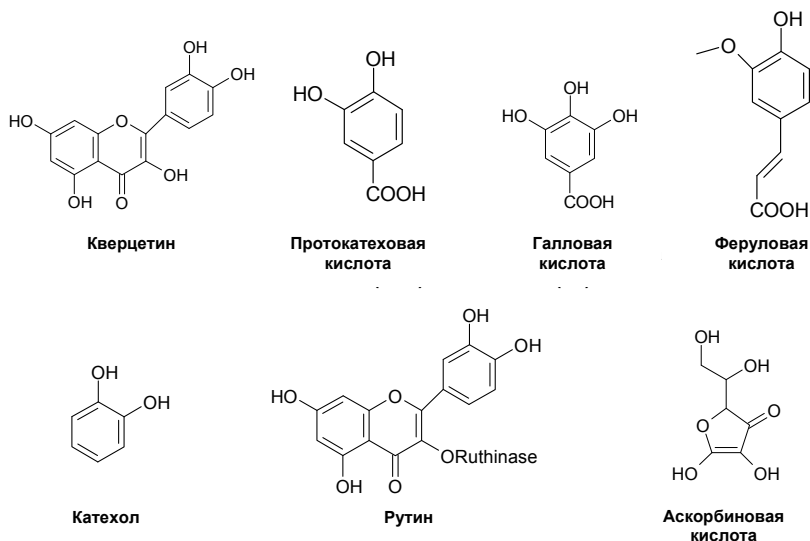


Рис. 1.5. Примеры антиоксидантов-восстановителей фенольного типа

Кроме пищевых продуктов и биообъектов, АО вводят в состав лекарственных препаратов, биологически активных добавок и даже косметических средств. Естественно, информация о суммарном содержании АО в разных объектах используется в рекламных целях, хотя ни стандартизованных методик анализа, ни нормативов содержания АО нет.

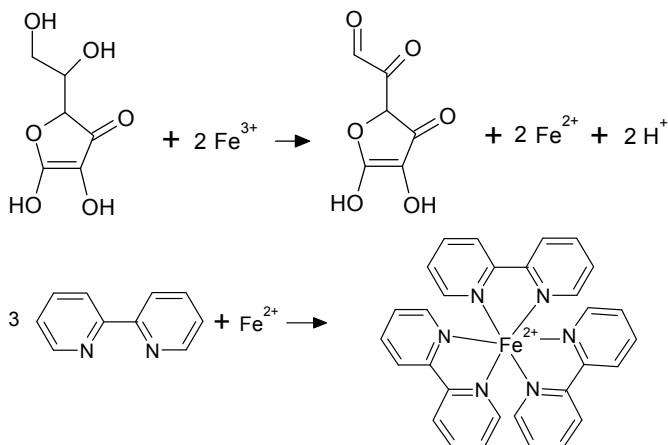
Известны многочисленные методики определения индивидуальных АО в пищевых продуктах [71]. Обычно для этого используют ВЭЖХ или капиллярный электрофорез. Более важной, но в целом нерешенной задачей является оценка суммарного

содержания АО. Определять суммарное содержание АО можно и без разделения их природных смесей, в частности для этого используют спектрометрические измерения обобщенных сигналов и хемометрические алгоритмы обработки полученных данных. Примером может быть определение суммарного содержания полифенольных АО в разных сортах зеленого чая [13].

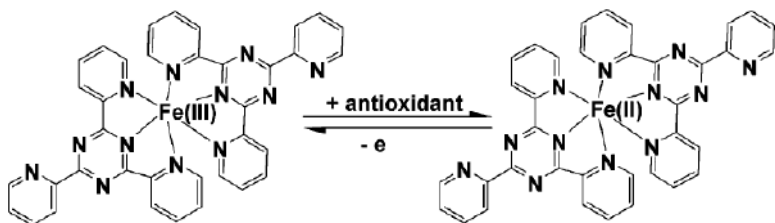
К сожалению, недостаточная изученность природных смесей АО и трудоемкость получения многомерных градуировок препятствуют широкому применению таких методик. Поэтому вместо c_{Σ} обычно определяют *суммарную антиоксидантную активность* соответствующих смесей [6]. Этот показатель также называют суммарной антиоксидантной емкостью (*total antioxidant capacity*) [14]. Фактически АОА – это концентрация стандартного вещества, которая в заданных условиях обеспечивает такую же величину сигнала, как 1 г или 1 мл исследуемой пробы.

Для определения АОА пищевых продуктов используют электрохимические, спектрометрические и кинетические методы. Предполагается проведение модельных реакций в условиях *in vitro* и выражение результата анализа в пересчете на стандартное вещество, например тролокс, кверцетин или аскорбиновую кислоту. Методики имеют условные названия (DPPH, TEAC, FRAP, ORAC и др.). Результаты выражают в виде интегральных показателей. Показатели первого типа (НАТ-показатели) ориентированы на оценку суммарного содержания веществ, ингибирующих свободнорадикальные процессы путем обрыва цепей. Механизм таких реакций довольно хорошо изучен [70]. Показатели второго типа (ЕТ-показатели) применяют для определения антиоксидантов-восстановителей, реагирующих не столько с пероксидными радикалами, сколько с другими активными формами кислорода (сильными окислителями). Численные значения обобщенных показателей состава одного и того же объекта могут сильно различаться и даже иметь разную размерность, но для совокупности однотипных объектов значения двух показателей одного типа часто закоррелированы.

Часто АОА определяют методом FRAP, вводя в избытке ионы Fe^{3+} и фотометрический реагент – трипиридилтриазин, 1,10-фенантролин, 2,2'-дипиридил и др. [72; 73]. Под действием АО, например аскорбиновой кислоты, образуется интенсивно окрашенный комплекс железа(II), например с 2,2'-дипиридилем (см. схему).



Приведенная схема не является окончательно доказанной. Ряд авторов считает, что вначале образуется малопрочный комплекс железа(III) с участием вспомогательного лиганда, а затем он постепенно восстанавливается ЕТ-антиоксидантами до интенсивно окрашенного комплекса железа(II) с тем же лигандом. Это можно показать на примере восстановления комплексов железа с трипиридилтриазином [67].



Окраска развивается медленно, поэтому аналитический сигнал измеряют через τ минут после смешивания реагентов, не дожидаясь установления равновесия. АОО находят по градуировочному графику, предварительно построенному по растворам стандартного вещества $X_{\text{ст}}$. Отметим, что информация о пищевых продуктах как источниках АО получена главным образом с применением метода FRAP [69]. Однако при проверке на модельных смесях оказалось, что этот метод часто дает значения АОО, которые сильно отличаются от действительного содержания антиоксидантов, причем результаты анализа хорошо воспроизводимы, но бывают как сильно завышенными, так и сильно заниженными, в зависимости от состава пробы и природы стандартного вещества [73; 74]. Поэтому несколько групп исследователей (Стамбул, Краснодар, Омск, Белгород, Сингапур и др.) выбрали этот интересный метод в качестве модельного объекта для выяснения общих закономерностей, характеризующих любые методы определения антиоксидантной активности.

Анализ литературы по методам определения антиоксидантов в пищевых продуктах позволяет сформулировать три проблемы, три направления исследований. Какие причины вызывают отклонение интегральных показателей от действительных значений суммарного содержания однотипных веществ, например АО? Как устранить эти отклонения? Как точно оценить суммарное содержание однотипных веществ по величине интегрального показателя? Ответ на эти вопросы – в следующих главах книги.

Глава 2

ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ИХ ВИДЫ

2.1. Общая характеристика интегральных показателей

2.1.1. Терминологические проблемы

Термин «**интегральный показатель**» (от лат. *integer* – «целый») широко используется в науке и технике. Единой общепринятой дефиниции этот термин не имеет, с его помощью характеризуют самые разные объекты и процессы. В **технике** интегральным показателем качества, в соответствии с ГОСТ, называют отношение суммарного полезного эффекта от эксплуатации или потребления некоторой продукции к суммарным затратам на ее создание и эксплуатацию [75]. В **экономике** термин «интегральный показатель» (ИП) применяют без каких-либо ограничений. С точки зрения экономиста, ИП – это любые обобщенные, сводные или синтетические показатели, имеющие отношение к экономике и финансам [76]. Примерами могут быть случайно выбранные из Интернета названия статей: «Интегральный показатель экономической эффективности инвестиционных проектов», «Интегральные показатели пространственных моделей развития стран мира» и даже «Интегральные показатели качества жизни». В **экологии** интегральными показателями обычно называют расчетные характеристики состояния исследуемого объекта (биоценоза, популяции, водоема и т. д.), полученные на основе наблюдений или измерений, причем характеристики могут включать разнородные показатели и их нормативные значения.

Пример – гидробиологический индекс сапробности [77]. Экологи применяют термин ИП и в другом смысле. Так, по А.И. Орлову, «проблема построения интегрального показателя качества экологической обстановки... еще не решена окончательно. Напрашивается такой показатель, как средняя ожидаемая продолжительность предстоящей жизни» [78].

Все перечисленные показатели упомянуты только для того, чтобы уберечь читателя от терминологической путаницы. Они не имеют прямого отношения к **интегральным показателям химического состава**, которые рассматриваются в этой книге. В химических исследованиях ИП чаще всего используют, характеризуя состав природных и сточных вод. Причем гидрохимики стали применять этот термин сравнительно недавно, наряду с привычными им терминами «обобщенные показатели», «суммарные показатели», «общие показатели», «групповые показатели». Отметим, что ни один из вышеперечисленных терминов не регламентирован действующими ГОСТ 27065-86 «Гидрохимия. Качество вод. Термины и определения» и 17.1.1.01-77 «Охрана природы. Гидросфера. Использование и охрана вод. Основные термины и определения». Обычно все перечисленные словосочетания применяют как синонимы, не заботясь о строгой терминологии. Особенно это заметно в текстах, переведенных с английского. В англоязычной химической литературе используется более узкий и лучше определенный набор терминов, обозначающих обобщенные (интегральные) показатели химического состава. Обычно в названиях таких показателей входят характерные слова *index* или *total*, указывающие на обобщающий характер термина, например *total petroleum hydrocarbons*, *total protein*, *gluten index*, но есть и исключения (*salinity*). Нередко название показателя состава совпадает с названием группы однотипных веществ (*fatty acids*, *PAHs*, *VOGs*). Такие же названия есть в русскоязычных текстах: *нефтепродукты* и *поверхностно-активные вещества* – не только группы веществ, но и обобщенные показатели состава, характеризующие изучаемые объекты.

Сравнивая частоту и области применения подобных терминов в отечественной научной литературе, следует отметить, что чаще других используют термин «обобщенные показатели». Понятие «общие показатели» со времен Ю.Ю. Лурье используют, характеризуя лишь очень широкие группы веществ, присутствующих в исследуемых объектах [79], а понятие «групповые показатели» применяют, когда речь идет о более узких выборках, но и те, и другие – обобщенные показатели.

В нормативных документах используют понятия «обобщенные показатели качества воды» и «обобщенные показатели химического состава». Примером может быть СанПиН 2.1.4.1074-01 [80]. В этом документе к числу обобщенных показателей отнесены водородный показатель, общая минерализация, общая жесткость, перманганатная окисляемость, показатель «нефтепродукты» (суммарно), анионоактивные ПАВ и фенольный индекс. Сюда же можно отнести такие групповые показатели, как сумма изомеров ДДТ и суммарное содержание полифосфатов, включенные в тот же документ в другом месте.

Перечисленные показатели сегодня часто называют интегральными, но в нормативных документах интегральные показатели химического состава пока что не упоминаются. Дефиниция этого термина отсутствует и в научной литературе. В настоящей книге, во избежание путаницы, будут использоваться только термины «обобщенные показатели» и «интегральные показатели». Родственные им термины «суммарные показатели», «общие показатели» и «групповые показатели» использоваться не будут, поскольку в этом нет необходимости. Можно сослаться на известное высказывание, приписываемое то Конфуцию, то Декарту: *неприятности появляются из-за того, что одну и ту же вещь называют различными словами, а одним и тем же словом называют разные вещи.*

С точки зрения автора, в аналитической химии термин «интегральные показатели» является не синонимом термина «обобщенные показатели», а названием одной из групп обобщенных

показателей. Интегральные показатели отличаются от других обобщенных показателей способом расчета (пересчет на стандартное вещество), свойствами (множественность, многозначность) и назначением (оценка содержания однотипных веществ).

2.1.2. Взаимосвязь разных показателей

Детализированная система обобщенных показателей качества гидрохимических объектов была предложена А.М. Никаноровым [81]. Он разделил все показатели на две группы – натуральные и относительные (расчетные). Первая группа – это показатели, определяемые в ходе химического анализа. Поскольку это очень обширная группа, автор выделяет три подгруппы натуральных показателей: дифференцированные, групповые и интегральные. *Дифференцированные* показатели – «ингредиенты качества воды, характеризующие только одно из ее свойств» [81, с. 451]. К таким показателям автор относит, например, содержания хлоридов, сульфатов, ионов кальция и т. п., т. е. это результаты определения индивидуальных веществ. *Групповые* показатели несут в себе информацию о содержании групп веществ (нефтепродукты, фенолы и др.). *Интегральные показатели* характеризуют группу однородных свойств воды, обусловленных физико-химическими, биохимическими процессами. В эту группу автор включает pH, растворенный в воде кислород, жесткость воды и др. Для оценки качества воды все натуральные показатели сравнивают с их нормативными значениями.

А.М. Никаноров использует слово «интегральные» и для характеристики некоторых относительных (расчетных) характеристик. С точки зрения автора, это «оценки загрязненности и качества поверхностных вод, уплотняющие исходную информацию по широкому спектру наиболее информативных гидрохимических параметров... разнородных по своим свойствам, с целью получения однозначной оценки» [81, с. 455–456]. При всей расплывчатости этого определения понятно, что речь идет о тех показателях, которые другие авторы называют комбинаторными (или ком-

плексными) показателями загрязненности водоемов. При их вычислении, кроме результатов многократного определения разнотипных веществ, используют и нормативы предельного содержания этих веществ. Наиболее известным комбинаторным показателем является *индекс загрязненности водоемов* (ИЗВ), предполагающий суммирование шести разных показателей, каждый из которых нормируется по величине соответствующей ПДК [82]. Четко отличая комбинаторные показатели от «натуральных», А.М. Никаноров все же называет и те, и другие *интегральными*, что может привести к ошибкам. Не ясно также, чем принципиально различаются используемые в его схеме «групповые» и «интегральные» натуральные показатели. Тем не менее изложенная схема применяется многими гидрохимиками и даже приводится в учебниках [28].

Аналитики, занимающиеся гидрохимическим анализом, не раз пытались уточнить подобные схемы, включить в них новые объекты (в частности, сточные воды), дать более четкие и логичные дефиниции. Так, Ю.М. Дедков неоднократно подчеркивал, что вся методология объективной оценки качества воды основана на измерении обобщенных показателей [11]. Им была предложена следующая дефиниция: **обобщенный показатель качества воды – это определяемая непосредственным измерением количественная характеристика свойства воды, обусловленная совместным влиянием содержащихся в ней компонентов и необходимая для оценки ее качества** [40]. С помощью обобщенных показателей свойств можно рассчитать и другие показатели исследуемой пробы (жесткость, токсичность, кислотность). Позднее Ю.М. Дедков стал четко различать *обобщенные показатели свойств*, соответствующие вышеприведенной дефиниции, и *интегральные (обобщенные) показатели состава*, используемые как характеристики суммарного содержания определенных групп однотипных веществ [10]. Так, электропроводность, интенсивность озонохемилуминесценции или светопоглощение исследуемой воды при некоторой длине волны являются обобщенными показателями свойств, а ХПК или

фенольный индекс – интегральными показателями состава. С этим уточнением полностью согласен и автор этих строк.

По Ю.М. Дедкову, разработка системы обобщенных показателей качества предусматривает решение ряда задач: выявление показателей, важных для того или иного вида водопользования, уточнение их смыслового значения, выбор и установление размерности этих показателей, создание методик их определения. Особо подчеркивается, что любой обобщенный показатель должен обладать свойством интерпретируемости, т. е. иметь однозначно трактуемое смысловое содержание [11]. Вероятно, приведенный перечень задач можно отнести не только к гидрохимическому анализу, но и к аналитической химии в целом.

Применительно к другим объектам химического анализа термин «интегральные показатели» стали использовать сравнительно недавно, преимущественно в области анализа объектов окружающей среды, нефтепродуктов и биообъектов. По мнению академика Ю.А. Золотова, определение интегральных (обобщенных) показателей состава – новая задача аналитической химии, важная не только для практики гидрохимического анализа, но и для множества смежных наук [83]. Более того, он указывает: «Определяя ИП, мы несколько трансформируем саму парадигму аналитической химии, меняем, расширяем ее целеполагающие установки» [9]. Правда, перечень ИП по Ю.А. Золотову включает широкий набор известных показателей, характеризующих как суммарные содержания, так и природу соответствующих групп однотипных веществ. Это химическое и биохимическое потребление кислорода, общий органический углерод, общее содержание летучих органических соединений, фенольный индекс, общая токсичность, суммарное содержание тяжелых металлов, общее содержание углеводов в почве. В области анализа и контроля пищевых продуктов значение имеют общее содержание белка, жирность молока, определение «горькости» пива, антиоксидантная активность, суммарное содержание жирных кислот. Свежесть яблочного сока можно оценить по отношению содержания

Л-яблочной кислоты к общему содержанию яблочных кислот. При оценке нефтей определяют общее содержание ароматики, в случае углей – зольность. Автор подчеркивает, что для оценки подобных показателей используют обычные методы химического анализа (особенно электрохимические и спектроскопические), не требующие разделения однотипных веществ. Методики анализа должны быть по возможности упрощены и автоматизированы. Новый подход к интегральным показателям химического состава, по Ю.А. Золотову, заключается в более широком взгляде на проблему, в попытках определить место ИП в анализе, классифицировать их, разобраться в их особых метрологических свойствах.

В большой обзорной статье [2] известный испанский аналитик М. Валкарсель охарактеризовал множество различных показателей состава и свойств и дал свою дефиницию обобщенных показателей. С его точки зрения, такой показатель (*total index*) – **это некоторая измеряемая величина (*measurand*), характеризующая определенную группу химических соединений, сходных по своей природе (структуре молекулы) и/или по своему функциональному поведению.** Несомненно, все известные обобщенные показатели отвечают этой дефиниции, однако она представляется слишком широкой. Возникает проблема выбора физической величины, которая должна характеризовать группу однотипных соединений. Ведь для каждой группы существует множество измеряемых характеристик, и часть из них не имеет прямого отношения к химическому анализу, например токсичность. Другие физические величины характеризуют свойства, отличающие вещества данной группы от других и важные для их опознавания. Например, высокий квантовый выход люминесценции отличает полиарены от других углеводородов и может являться идентификационным признаком. Лишь немногие физические величины характеризуют содержание веществ данной группы и важны для количественного химического анализа. Примерами могут быть массовая доля или суммарная концентрация однотипных веществ. Токсичность, выход люминесценции и суммарная

концентрация – это очень разные показатели, и объединить их под общей вывеской *total index* довольно трудно. Правда, М. Валкарсель указывает, что главная цель применения обобщенных показателей – оценка суммарного содержания однотипных веществ. Следовательно, в совокупности обобщенных показателей основную роль должны играть показатели количественного состава. Действительно, из приведенного Валкарселем перечня (около ста показателей) подавляющее большинство – это оценки количественного состава (*total protein, total content of aflatoxins, total aromaticity, phenol index* и др.). Не более десятка показателей характеризуют свойства группы однотипных веществ (*cetane index, sweetness index*), но эти свойства, важные для качественного анализа, тоже зависят от состава группы.

Совокупность показателей, отвечающих приведенной выше дефиниции, включает сильно различающиеся элементы. Если выделить узкие однородные группы обобщенных показателей, будет гораздо легче выявить особенности применения и метрологическую специфику показателей каждой группы. В работе [2] особое внимание уделено классификации обобщенных показателей. Предложено несколько способов классификации:

➤ *По области применения показателя* (анализ объектов окружающей среды, анализ пищевых продуктов, клинический анализ, технический анализ). Первая группа включает наибольшее количество показателей.

➤ *По виду данных, на основании которых вычисляют показатель*. Это может быть обобщенный сигнал всех компонентов группы или множество сигналов отдельных компонентов.

➤ *По способу представления показателя*. Большинство обобщенных показателей выражают в пересчете на концентрацию стандартного вещества (или смеси стандартных веществ). Размерность таких показателей соответствует единицам массовой или молярной концентрации. Показатели, выраженные в условных единицах, или в единицах измерения аналитического сигнала, используют гораздо реже. Сравнительно редко применяют и безраз-

мерные показатели, вычисляемые по соотношению концентраций или сигналов. Так, по соотношению однотипных сигналов, измеренных на разных длинах волн, пробу можно отнести к той или другой группе веществ или судить о присутствии в ней веществ искомой группы.

Классификация по способу представления показателя представляется наиболее важной. Из множества обобщенных показателей, характеризующих группу однотипных веществ, следует выделить те, которые характеризуют суммарное содержание этих веществ путем пересчета обобщенного сигнала на содержание стандартного вещества (рис. 2.1). Эту большую группу показателей используют в количественном анализе. Целесообразно присвоить им специальное название, выделив их из множества обобщенных показателей. С точки зрения автора данной книги, таким названием должен быть термин **«интегральные показатели»** или, при необходимости большей определенности, – «пересчетные интегральные показатели». По способу пересчета можно выделить четыре подгруппы интегральных показателей (см. раздел 2.3).



Рис. 2.1. Взаимосвязь обобщенных и интегральных показателей

Термин «интегральные показатели» еще не вошел в учебники, он мало знаком квалифицированным аналитикам-практикам, даже тем, кто ежедневно определяет какие-либо интегральные показатели по известным методикам. Налицо аналогия с мольеровским героем, только под старость узнавшим, что он, оказывается, всю жизнь говорил прозой.

Очевидно, нужны новые подходы к определению суммарного содержания однотипных веществ, развитие специального математического аппарата, выявление общих закономерностей. Словом, необходимо развитие *теории интегральных показателей*. На ее базе можно будет оптимизировать известные способы оценки суммарного содержания однотипных веществ или создавать новые способы.

2.1.3. Дефиниция интегральных показателей

На основании сопоставления разных показателей предлагается следующая дефиниция: ***интегральный показатель химического состава – это приблизительная оценка суммарного содержания группы аналитов, однотипных в структурном и/или функциональном отношении, найденная путем пересчета обобщенного аналитического сигнала на некоторое стандартное вещество.***

Эта дефиниция предложена В.И. Вершининым в статье [58] и обоснована в обзоре [36]. Она не противоречит дефиниции, предложенной Валкарселем, а уточняет ее применительно к одной – вероятно, самой важной – группе обобщенных показателей. Необходимость использования особого названия для показателей этой группы связана с их метрологическими особенностями. Как будет показано в разделе 2.2, оценка суммарного содержания одних веществ в пересчете на концентрацию других не согласуется с правилами, регламентирующими измерения физических величин [84]. Интегральные показатели зависят от выбора $X_{ст}$, способа и условий измерения сигнала [85], поэтому их нельзя смешивать с ре-

зультатами обычных измерений, в том числе с результатами прямого или хроматографического измерения суммарных содержаний (см. рис. 1.2). Именно поэтому «метод-зависимые» оценки суммарных содержаний, пересчитанные на $X_{\text{ст}}$, должны быть выделены в особую группу показателей химического состава и иметь особое название – *интегральные показатели*.

Конечно, вышеприведенная дефиниция не является единственно возможной или общепринятой, но специалисты не возражают против новой трактовки термина «интегральные показатели», хотя и отмечают ее несоответствие традициям гидрохимического анализа. Поэтому при дальнейшем изложении материала применение термина «интегральный показатель» означает, что речь идет о приблизительных оценках суммарного содержания однотипных веществ, выраженных в пересчете на стандартное вещество. Размерность таких показателей соответствует обычным размерностям суммарных содержаний (моль/л, моль-экв/л, г/л, % масс.). Хорошим примером интегрального показателя, полностью соответствующего вышеприведенной дефиниции, является оценка суммарного содержания белков в биологических жидкостях в пересчете на концентрацию бычьего альбумина (мг/л). Обобщенным сигналом в этом случае является оптическая плотность раствора при выбранной длине волны. Сигнал формируют с помощью фотометрического реагента пирогаллолового красного [86]. Результат анализа – ИП «общий белок» – зависит не только от суммарного содержания белков в пробе, но и от их соотношения, однако это влияние не столь велико, как при использовании других реагентов или других способов измерения аналитического сигнала белков.

Примеры ИП, применяемых в анализе природных и сточных вод, приведены в табл. 2.1. Место этих показателей в системе оценки качества воды показано на рис. 1.1.

Таблица 2.1

**Некоторые интегральные показатели состава
природных и сточных вод**

Показатель	Определяемые соединения	Способ измерения	Стандартное вещество
Фенольный индекс (<i>phenol index</i>)	Фенолы, реагирующие с 4-аминоантипирином	Вид*	Простейший фенол (C_6H_5OH)
Нефтепродукты (<i>total hydrocarbon index, oil index</i>)	Углеводороды (алканы, нафтенy, арены), экстрагируемые из воды и не сорбируемые Al_2O_3	ИК, УФ, ФЛ	Смесь Симарда, смесь ГОИН, <i>n</i> -гептан и др.
АПАВ (<i>anionic detergents, MBAS</i>)	Алкилбензосульфонаты и сульфозефиры, дающие экстрагируемые ассоциаты с катионными красителями	Вид, ФЛ	Додецилсульфат натрия
КПАВ (<i>cationic detergents</i>)	Четвертичные аммониевые соединения, имидазолины и алкиламины, дающие экстрагируемые ассоциаты с анионными красителями	Вид, ФЛ	Цетилпиридиний хлорид
ХПК _{Cr} (<i>chemical oxygen demand</i>)	Соединения, реагирующие в сильноокислой среде с $K_2Cr_2O_7$	Хроматометрия	Кислород [2], бифталат калия
Общая жесткость (<i>total hardness</i>)	Соли кальция, магния и других металлов, реагирующих с ЭДТА	Комплексонометрия	Ca^{2+} , CaO, $CaCO_3$
Соленость (<i>salinity</i>)	Сильные электролиты (соли)	Кондуктометрия	Стандартная смесь солей, KCl

* Спектрометрия в видимой области.

2.2. Метрологические аспекты применения интегральных показателей

2.2.1. Специфика интегральных показателей с точки зрения метролога

Метрологические аспекты применения обобщенных и, в частности, интегральных показателей не изучены. По мнению М. Валкарсея, это «черная дыра» химической метрологии. Не ясно, как оценить неопределенность интегральных показателей, как выявить источники неопределенности, как снизить эту неопределенность (ее систематическую составляющую). Более того, само выражение суммарного содержания некоторой группы аналитов в пересчете на $X_{\text{ст}}$ является *метрологически некорректным* [2; 36], подобно измерению расстояний в пересчете на дни пути или литры бензина. Выражение одной физической величины (массовой доли или концентрации некоторой группы однотипных веществ, например, суммы полифенолов) в единицах измерения другой физической величины (например, концентрации аскорбиновой кислоты) противоречит принципам выбора единиц измерения физических величин [84; 87] и принципу единства измерений [88]. Даже если аналиты и $X_{\text{ст}}$ близки по структуре и свойствам, результаты пересчета зависят от субъективного выбора $X_{\text{ст}}$ и способа измерения A_{Σ} , а также от состава смеси аналитов, присутствующих в пробе [58].

Без «метод-зависимых» ИП (термин принят в англоязычной научной литературе) сегодня обойтись нельзя, но их следует отличать от результатов обычных измерений, в том числе от результатов определения индивидуальных веществ. Утверждение «*фенольный индекс некоторой пробы равен 3 мг/л*» вовсе не означает, что суммарное содержание фенолов в пробе действительно составляет 3 мг/л или хотя бы приблизительно равно этому значению. Оно означает лишь то, что после обработки 4-аминоантипирином проба с неизвестным суммарным содержанием фенолов имеет такую же оптическую плотность, как раствор, содержащий 3 мг $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ в 1 л. Приравнивание искомого значения s_{Σ} числовому

значению ИП (c^*) ведет к появлению неопределенности (погрешности). Обозначим ее символом δc :

$$\delta c = (c^* - c_{\Sigma}) / c_{\Sigma}. \quad (2.1)$$

Известно, что величина δc нередко составляет десятки и даже сотни процентов (по модулю), причем δc всегда воспроизводится по знаку и довольно хорошо воспроизводится по абсолютной величине [25; 73]. Следовательно, в общей неопределенности ИП превалирует систематическая составляющая. Традиционные алгоритмы расчета доверительных интервалов (в частности, расчет по Стьюденту) ее не учитывают, что приводит к излишне оптимистическим представлениям о точности методик группового анализа с применением ИП. Проведенные эксперименты показали, что при определении суммы антиоксидантов систематическая погрешность имеет мультипликативный характер (табл. 2.2). Разбавление смеси заданного состава водой не меняет относительную погрешность оценки c_{Σ} .

Таблица 2.2

Результаты определения суммарного содержания антиоксидантов в модельных смесях (водных растворах) по методу FRAP

Смесь	Время экспозиции, мин	c_{Σ} , мкМ	c^* , мкМ	δC_{AK} , %
AK+KB+PT	60	2,0	2,6	+(31 ± 2)
		4,0	5,3	+(34 ± 9)
AK+KB+PT	10	2,0	2,3	+(17 ± 8)
		4,0	4,7	+(17 ± 4)
AK+KB+PT+ГК+ПКК	10	2,0	2,4	+(20 ± 12)
		4,0	4,7	+(18 ± 7)

Примечание. Значения c^* даны в пересчете на аскорбиновую кислоту.

Аналогичные выводы были получены при изучении других интегральных показателей. Если набор и соотношения концентраций анализов остаются неизменными, относительная погрешность δc практически не зависит от c_{Σ} . Это значит, что $c^* = k c_{\Sigma}$.

Но в этом случае судить о суммарном содержании однотипных аналитов можно просто по пропорции:

$$c_{\Sigma 1} / c_{\Sigma 2} = c^*_{1} / c^*_{2}. \quad (2.2)$$

Таким образом, мультипликативная систематическая погрешность оценки суммарного содержания с помощью ИП не мешает применять эти ИП в качестве *относительных* характеристик. В частности, динамику фенольного загрязнения некоторого водоема можно изучать, сопоставляя значения фенольного индекса проб, отобранных в разное время в одном месте и проанализированных по одной методике. Однако формула (2.2) неприменима для сравнения проб, имеющих существенно разный набор аналитов и/или разные соотношения их концентраций. По ФИ нельзя сравнивать суммарные содержания фенолов в сточных водах целлюлозно-бумажного и нефтехимического предприятий, поскольку речь идет о разных наборах фенолов [89; 90]. По той же причине считается некорректным сравнивать суммарные содержания антиоксидантов в разнотипных пищевых продуктах по значениям индекса АОА, даже если тот измерен по единой методике [69].

К сожалению, пересчетные ИП часто считают *абсолютными* характеристиками состава, отождествляя их с суммарными содержаниями соответствующих аналитов и устанавливая нормативы предельных значений ИП по аналогии с ПДК индивидуальных токсикантов. Сравнение ИП с какими-либо нормативами нежелательно хотя бы потому, что значения ИП, полученные для одной и той же пробы по разным методикам, могут различаться в несколько раз, в отличие от результатов определения индивидуальных веществ [3; 12]. Как уже отмечалось, установление нормативных значений для интегральных показателей (например, в экологическом мониторинге объектов окружающей среды) вызывает серьезные возражения специалистов [11; 27].

С точки зрения метролога, пересчетные интегральные показатели нельзя использовать в качестве абсолютной характеристики состава исследуемых объектов, но вполне можно использовать

как средство измерения c_{Σ} , при условии, что конечный результат анализа не будет выражен в единицах концентрации $X_{\text{ст}}$. Такой вариант анализа не противоречит правилам законодательной метрологии. Разумеется, определению c_{Σ} по величине ИП препятствует непредсказуемое влияние индивидуального состава присутствующей в пробе смеси однотипных веществ, однако величина c_{Σ} может быть найдена и в этом случае, только не в точечной, а в интервальной форме [91]. Более того, интервальное представление суммарного содержания однотипных веществ позволяет объективно и наглядно представить неопределенность результатов анализа, как то считается необходимым [92]. Вопрос об интервальных оценках суммарных содержаний будет детально рассмотрен в главе 6.

2.2.2. Множественность интегральных показателей

Пересчетные интегральные показатели имеют важную особенность, которую можно назвать *множественностью*. А именно, содержание любой группы однотипных веществ можно оценить с помощью нескольких разных ИП. Соответствующие ИП могут носить одинаковое наименование, но если они измеряются **разными методами, с использованием разных реагентов или в существенно разных условиях**, – их следует считать разными показателями. Дело в том, что при переходе к другому методу измерений нередко меняется и состав группы веществ, которые формируют обобщенный аналитический сигнал. Меняются и вклады разных веществ в обобщенный сигнал (коэффициенты чувствительности).

Рассмотрим пример, основанный на данных, полученных в работе [93]. Для оценки суммарного содержания антиоксидантов в овощах и фруктах турецкие исследователи⁴ использовали методы, условно обозначаемые TEAC, ORAC и DPPH. Результаты

⁴ Заметим, что группа исследователей из Турции, возглавляемая профессором Р. Апаком (Reshat Apak), в последние годы выполнила ряд интересных исследований в области аналитической химии антиоксидантов и занимает здесь ведущие позиции наряду с двумя группами американских ученых.

анализа, полученные разными методами, в пересчете на одно и то же стандартное вещество для каждого объекта достоверно различаются (табл. 2.3). Надо понять, определяли ли авторы один и тот же показатель по трем разным методикам, или речь идет о трех разных показателях, характеризующих суммарное содержание разных групп антиоксидантов и чувствительных к разным веществам.

Таблица 2.3

**Результаты определения показателей АОА
некоторых овощей и фруктов разными методами,
в пересчете на тролокс (мкмоль/100 г) [93]**

<i>Проба</i>	<i>Значения АОА</i>		
	<i>TEAC</i>	<i>ORAC</i>	<i>DPPH</i>
Апельсин	874	1814	600
Бананы	64	879	1100
Яблоки	159	2936	1400
Шпинат	849	2640	500
Брокколи	304	1590	600
Лук	182	1029	200
Помидоры	165	460	200

Проверим закоррелированность попарно сгруппированных данных. Так, для данных, полученных для разных объектов методами TEAC и DPPH, коэффициент линейной корреляции r равен $-0,232$ при $r_{0,05} = 0,755$, т. е. корреляция между результатами анализа статистически незначима. Линейные корреляции между попарно взятыми результатами анализа для методов ORAC и DPPH или для методов ORAC и TEAC также статистически незначимы. Результаты анализа одних и тех же проб, полученные с применением разных методов, различаются в несколько раз. Это позволяет предположить, что расхождения связаны не с погрешностями определения одного и того же показателя, а с измерением принципиально разных показателей, характеризующих содержание разных групп антиоксидантов. Действительно, в литературе

есть сведения, что при использовании перечисленных методов наборы определяемых веществ не совпадают. По методу ORAC в основном определяются антиоксиданты, реагирующие с пероксидными радикалами (НАТ-антиоксиданты), тогда как TEAC чувствителен и к ЕТ-антиоксидантам (восстановителям), а DPPH «чувствует» в основном ЕТ-антиоксиданты. Таким образом, речь идет о трех разных показателях. В любом случае расхождение между результатами определения АОА по разным методикам нельзя считать погрешностью анализа.

Очень похожие методы FRAP [73] и CUPRAC [93] основаны на применении разных реагентов-окислителей – соединений железа(III) и меди(II). Реакции проходят в кислой и в нейтральной среде соответственно. Оба метода нацелены на определение ЕТ-антиоксидантов, прежде всего полифенолов. Однако наборы веществ, формирующих обобщенный аналитический сигнал, не совсем одинаковы; так, тиольные антиоксиданты определяются методом CUPRAC, но не определяются методом FRAP (в его первоначальном варианте). Вероятно, это связано с различием стандартных потенциалов редокс-систем железа и меди. Оценки суммарного содержания антиоксидантов, полученные этими методами для одной и той же пробы, существенно различны, а результаты анализа разных пищевых продуктов этими методами плохо коррелируют друг с другом. Корреляция статистически значима только для серии проб очень близкого состава [94]. Следовательно, методики FRAP и CUPRAC – это способы определения двух разных ИП, которые следовало бы обозначить АОА CUPRAC и АОА FRAP. Единого интегрального показателя антиоксидантной активности, независимого от выбора метода и реагента, не существует.

Определяя суммарное содержание антиоксидантов методом FRAP, можно формировать их обобщенный сигнал с помощью разных вспомогательных реагентов – трипиридилтриазина, *o*-фенантролина, дипиридила, феррозина и других веществ, образующих окрашенные комплексы с образующимися под действием антиоксидантов ионами железа(II). Сравнение результатов анализа,

полученных для одних и тех же проб с применением этих реагентов, показывает, что они довольно близки [94; 95]. Сопоставление соответствующих выборок приводит к выводу о закоррелированности результатов анализа. Более того, нормированные коэффициенты чувствительности при определении индивидуальных антиоксидантов приблизительно соответствуют друг другу (табл. 2.4), что указывает на одинаковый механизм формирования аналитического сигнала, не зависящий от природы вспомогательного реагента и времени экспозиции [73]. По-видимому, замена вспомогательного реагента или изменение времени экспозиции не меняют относительную чувствительность сигнала к разным антиоксидантам, т. е. во всех случаях идет речь об определении одного и того же показателя AOA FRAP.

Таблица 2.4

Нормированные по АК коэффициенты чувствительности, полученные при определении AOA FRAP в условиях варьирования природы вспомогательного реагента и времени экспозиции

АО	DIP		Fe-PHEN		Fe-FZ	Fe-TPTZ
	10 мин [85]	60 мин [85]	60 мин [85]	30 мин [94]	30 мин [95]	6 мин [94]
KB	2,09	2,42	3,28	4,11	3,60	1,93
ГК	1,74	1,61	3,02	3,80	2,50	2,66
АК	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ФК	0,71	0,57	1,00	1,17	0,91	0,99

Множественность интегральных показателей, характеризующих состав одной и то же группы однотипных веществ, – факт, известный всем специалистам, но воспринимается ими он по-разному. Часть специалистов считает, что множественность ИП может привести к опасным последствиям [96]. Это особенно касается множества показателей антиоксидантной активности, не совпадающих друг с другом по размерности и не закоррелированных между собой. Соответствующие показатели и методики бесконтрольно используются для измерения содержания антиок-

сидантов в пищевых продуктах, напитках, биологически активных добавках, экстрактах лекарственных трав и т. п. На основании измерения одного (произвольно выбранного) из множества разных показателей не только рекламируются те или иные товары, но и выдаются официальные заключения. Это можно расценить как явное нарушение Федерального закона «Об обеспечении единства измерений», причем несоблюдение закона в данном случае может нанести ущерб здоровью населения страны. Авторы статьи [96] предлагают жестко регламентировать способ оценки АОА, выбрать и узаконить лучший интегральный показатель, а также набор стандартных методик его измерения применительно к разным объектам анализа. Естественно, авторы рекомендуют собственный способ оценки АОА (амперометрическое титрование) и соответствующую аппаратуру [6].

Другую точку зрения высказали в статье [97] томские специалисты. По их мнению, единый способ оценки АОА не только невозможен – ввиду многообразия протекающих в природе радикальных процессов, – но и не нужен. Наличие единственного стандартного метода, единственного показателя АОА может помешать исследователю выбрать один из известных (существенно различных) методов и соответствующий ему показатель АОА. Выбор должен быть сделан самим исследователем с учетом его целей, объектов и возможностей.

Очевидно, обе позиции логичны, но их не нужно противопоставлять и абсолютизировать. Действительно, исследователю процессов, протекающих с участием антиоксидантов, требуется целый арсенал методов и показателей, но для массового аналитического контроля содержания антиоксидантов, например в пищевой промышленности, достаточно иметь две-три стандартные методики. Не менее двух, поскольку следует учесть наличие двух основных групп антиоксидантов (НАТ и ЕТ), суммарные содержания которых обычно определяют разными способами, ведущими к разным наборам ИП. Этот взвешенный подход к способам оценки АОА предложен авторами работ [14; 68].

2.2.3. Многозначность интегральных показателей

Возникает вопрос, если антиоксидантная активность данной пробы измерена одним и тем же способом, с использованием одного и того же реагента и в одинаковых условиях, но результат анализа выражен **в пересчете на разные стандартные вещества** – мы получаем один и тот же показатель или разные? Значения c^* сильно меняются в зависимости от выбора $X_{ст}$, но они, безусловно, характеризуют одну и ту же группу аналитов с помощью одного и того же обобщенного аналитического сигнала. Следовательно, речь идет об одном и том же показателе. Примером могут быть результаты определения AOA FRAP для одной и той же смеси (табл. 2.5) и для ряда смесей (табл. 2.6).

Таблица 2.5

Результаты (c^* , мкМ) и погрешности (δc , %) оценки суммарного содержания антиоксидантов по методу FRAP в одной и той же смеси в пересчете на разные стандарты

Стандартное вещество, $X_{ст}$	c^* , мкМ	δc , %
Кверцетин	1,5	–63
Галловая кислота	2,3	–43
Протокатеховая кислота	3,6	–10
Рутин	3,6	–10
Аскорбиновая кислота	3,9	–3
Феруловая кислота	6,5	+62

Примечание. Расчет δc по формуле (2.1). Состав смеси, мкМ: АК – 1,5; КВ – 1,5; ПКК – 1,0. c_{Σ} = 4,0 мкМ.

Таблица 2.6

Результаты (c^* , мкМ) и погрешности (δc , %) определения суммарного содержания антиоксидантов по методу FRAP в разных смесях в пересчете на разные стандарты

Состав смеси	Отношение концентраций	c_{Σ} , мкМ	c^* , мкМ			δc , %		
			АК	КВ	Fe(II)	АК	КВ	Fe(II)
АК+ГК	2,0:2,0	4,0	5,7	2,4	26,7	43	–40	568
КВ+ФК	0,5:3,5	4,0	3,3	1,4	15,3	–18	–65	283
КТ+ПКК	2,0:2,0	4,0	3,5	1,4	16,1	–13	–65	303
АК+КТ+ПКК	1,5:1,5:1,0	4,0	3,7	1,5	17,2	–8	–63	330

В выборках однотипных проб результаты анализа, полученные по одной методике, но выраженные в пересчете на разные стандарты, всегда достоверно закоррелированы. Более того, результаты, полученные с применением одного стандарта, могут быть довольно точно выражены в единицах другого стандарта с помощью заранее полученных уравнений количественного соответствия [98]. Так, результат, полученный для любой пробы в пересчете на аскорбиновую кислоту, будет выше, чем в пересчете на кверцетин (примерно в 2,4 раза). Однако он будет намного меньше, чем при пересчете сигнала на железо(II).

Можно сделать теоретическое обобщение: любой интегральный показатель химического состава является *многозначным*, т. е. может быть выражен в пересчете на разные стандарты. Выбор того или иного стандарта не меняет состав группы определяемых веществ и не влияет на формирование обобщенного аналитического сигнала, но приводит к разным значениям ИП. Очевидно, многозначные оценки суммарного содержания однотипных веществ с применением интегральных показателей имеют высокий уровень неопределенности. Подбирая подходящее стандартное вещество, можно снизить эту неопределенность, но ее нельзя полностью исключить.

2.3. Классификация интегральных показателей

Если считать, что интегральные показатели – это приближенные оценки суммарного содержания некоторых однотипных веществ в пересчете на стандартное вещество, то эта группа показателей получает внутреннее единство, прежде всего в метрологическом аспекте. Тем не менее можно выделить некоторые подгруппы таких показателей, провести их классификацию.

Простейшим способом классификации ИП является разделение по характеризующим группам однотипных веществ (антиоксиданты, углеводороды и т. п.). Как было показано в разделе 2.2, любая группа антиоксидантов характеризуется целым рядом ИП,

не дублирующих, а дополняющих друг друга. Другой возможный способ классификации – по видам и объектам анализа, для которых предназначен тот или иной показатель. Свои наборы ИП используют в экологическом мониторинге для характеристики природных и сточных вод (табл. 2.1), в анализе пищевых продуктов, в техническом анализе нефтепродуктов и т. д. Однако обе классификации основаны на чисто внешних отличиях. Показатели, применяемые для оценки суммарного содержания разных групп веществ, ничем существенным друг от друга не отличаются.

Можно выделить две большие группы ИП, различающиеся по способу формирования аналитического сигнала. В одну группу попадают ИП, определяемые с применением химических реакций (фенольный индекс, общий белок, показатели антиоксидантной активности, ХПК и др.). В другую – ИП, определяемые чисто спектрометрическими методами без проведения химических реакций (углеводородный индекс, показатели структурно-группового состава нефтепродуктов, показатель *Oil and Grease* и некоторые другие). В рамках этой классификации различие групп ИП проявляется сильнее, чем в предыдущих случаях. Как правило, способ формирования сигнала влияет на прецизионность и чувствительность измерений.

Наиболее важной с практической точки зрения представляется классификация по способу расчета ИП, который определяется выбором стандартного вещества (рис. 2.2).

Во всех случаях исходной величиной для расчета ИП служит обобщенный аналитический сигнал. Его формируют все вещества, относящиеся к искомой группе и присутствующие в анализируемой пробе. Чаще всего в качестве стандартного вещества используют одно из соединений, относящихся к той же группе веществ, что и аналиты. По заранее приготовленным растворам с точно известными концентрациями $X_{\text{ст}}$ строят градуировочный график, как правило, прямолинейный и проходящий через начало координат. Стандартное вещество может быть одним из компонентов пробы (внутренний стандарт) или заведомо отсутствовать

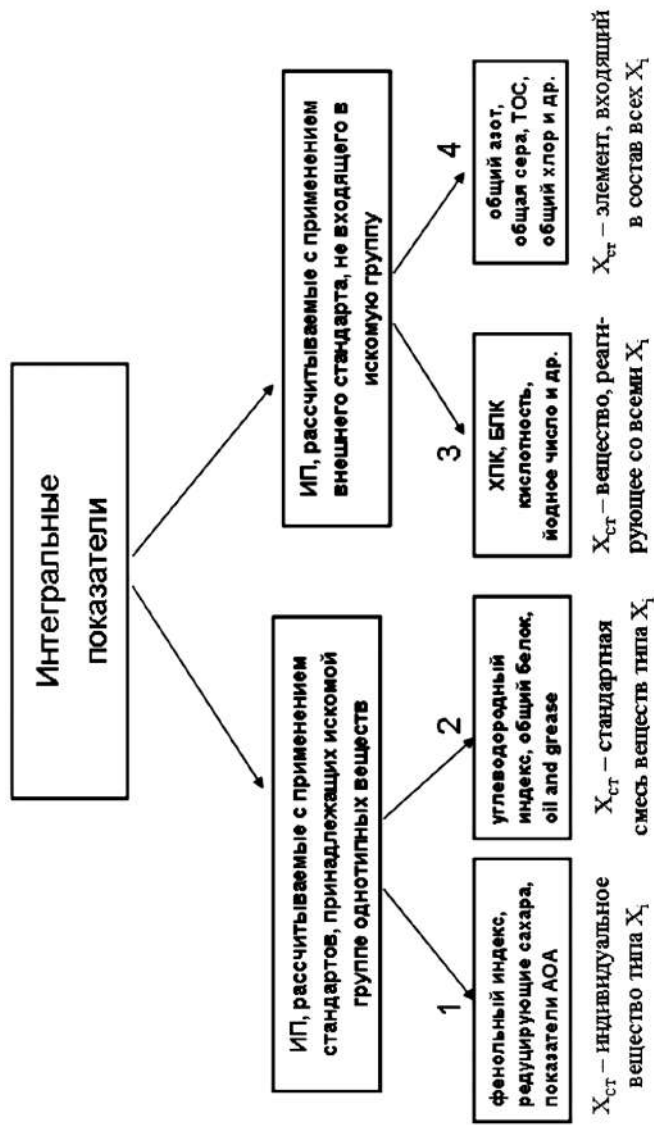


Рис. 2.2. Классификация пересчитанных интегральных показателей

в ней (внешний стандарт). Так, содержание антиоксидантов в вине можно выражать и в пересчете на галловую кислоту, которая почти наверняка присутствует в составе вина, и в пересчете на тролокс, который в винах отсутствует. Правильность анализа с применением показателей **первой группы** зависит не от того, какой стандарт (внутренний или внешний) используют, а от чувствительности определения выбранного стандарта, которая должна совпасть с чувствительностью определения смеси аналитов, присутствующих в данной пробе. Это требование к стандартным веществам – основное, но не единственное, остальные будут обсуждаться в разделе 5.3.

Если индивидуальные соединения, определяемые по выбранной методике с требуемой чувствительностью, найти не удалось или пользоваться ими по каким-либо причинам неудобно, применяют ИП **второй группы**. Они определяются в пересчете на некоторую стандартную смесь веществ искомой группы. Подобрать состав подходящей стандартной смеси и безошибочно воспроизвести его довольно трудно, такие смеси выпускаются в качестве стандартных образцов особого типа. Примером может быть ГСО 7822-2000, содержащий набор углеводов, соответствующий по составу стандартной смеси Симарда [99] и используемый для определения углеводородного индекса.

Другой пример – стандартные образцы (так называемые *калибраторы*) для определения общего белка. Применение единых калибраторов позволяет уменьшить погрешности измерений и добиться межлабораторной прецизионности. Часто используют калибраторы фирмы «Вектор-Бест», содержащие альбумины и глобулины в соотношении 7:3, характерном для мочи. Однако эти калибраторы обеспечивают правильность результатов анализа только при использовании методики, основанной на взаимодействии белков с пирогалловым красным. Для других методик предпочтительнее применение калибраторов иного состава [100].

ИП первой и второй группы обычно рассчитывают по одномерным градуировкам, построенным с помощью одного стандартного вещества или одной стандартной смеси. Однако в последние

годы в арсенале аналитиков появились методы, основанные на применении многомерных градуировок, построенных с применением нескольких стандартных смесей известного состава (с разным набором и разным соотношением компонентов искомой группы) [13; 43; 101]. Многомерную градуировку можно использовать для расчета соответствующего ИП не по одному, а по целой серии стандартов. Этот прием позволяет повысить точность оценки суммарных содержаний (см. раздел 6.2).

Третья группа интегральных показателей обычно связана с проведением титрования. Титрант одновременно реагирует с однотипными компонентами пробы, а объем затраченного титранта служит обобщенным аналитическим сигналом. Этот объем обычно пересчитывают на массу реагента или на массу некоторого стандартного вещества, которое не входит в искомую группу аналитов. Суммарное содержание органических веществ, содержащихся в 1 л исследуемой воды (природной или сточной) и реагирующих с перманганатом или дихроматом в течение определенного времени, выражают в пересчете на массу кислорода (мг), которая пошла бы на окисление тех же органических веществ (см. обзор [40]). Соответствующие показатели известны под названием «химическое потребление кислорода» и «биохимическое потребление кислорода». Названия явно неудачны, но их сохраняют, вероятно из уважения к историческим традициям. Эти показатели в разной степени чувствительны к разным органическим веществам, что связано не только с разной величиной их эквивалентов, но и разной скоростью окисления, а также возможностью неполного окисления. Некоторые вещества вообще не удастся окислить без введения специальных катализаторов [102]. В последние годы интерес к ХПК и БПК снизился из-за появления более точных и чувствительных способов оценки содержания органических веществ, основанных на высокотемпературных реакциях и приводящих к ИП четвертой группы ($C_{орг}$, ТОС).

К третьей группе относятся и некоторые показатели, не связанные с проведением титрования. Примером может быть предло-

женный Б.К. Зуевым новый ИП «термическое потребление кислорода» [47], во многом аналогичный показателю ХПК, но не требующий реактивов и свободный от недостатков прототипа. Этот показатель измеряется методом окситермографии, описанным в разделе 1.4, и выражается в пересчете на массу кислорода, затраченного на окисление всех органических веществ, содержащихся в пробе.

Интегральные показатели **четвертой группы** определяют методами элементного анализа. Так, показатель «общий азот» характеризует содержание азотсодержащих веществ, но выражают его в пересчете на содержание азота. Последнее находят разными методами, чаще всего используют титриметрический метод Кьельдаля. В последние годы показатели четвертой группы стараются определять без проведения химических реакций. Примером может быть определение «общей серы», этот показатель можно быстро, селективно и довольно точно измерить рентгенофлуоресцентным методом, без перевода пробы в раствор и вообще без какой-либо пробоподготовки [103]. Проблема в том, что иногда потребителя интересуют именно азотсодержащие вещества (например, белки или сульфиды), а не содержание азота или серы. В таких случаях заранее определяют эмпирические пересчетные коэффициенты, характеризующие среднее содержание азота в азотсодержащих веществах искомого типа.

Очевидно, интегральные показатели 1-й и 2-й групп принципиально отличаются от показателей 3-й и 4-й групп. Методы определения показателей 3-й и 4-й группы фактически лишены той метрологической специфики, которая отличает показатели 1-й и 2-й группы, а расчеты результатов анализа тривиальны. Теоретические исследования, посвященные показателям 3-й и 4-й группы, в последние годы не проводились. Омские исследователи ими также не занимались, в этом не было практической необходимости – показатели 3-й и 4-й групп определяются достаточно точно. Далее они рассматриваться не будут. Напротив, источники и способы уменьшения систематических погрешностей при определении ИП 1-й и 2-й групп заслуживают детального рассмотрения.

2.4. Неопределенность интегральных показателей

2.4.1. Способы выявления систематических погрешностей

Способы первоначальной проверки, валидации и метрологической аттестации методик количественного химического анализа хорошо разработаны применительно к определению индивидуальных веществ. Соответствующие рекомендации можно найти в книгах В.И. Дворкина, А.Н. Смагуновой, Н.П. Пикулы и других авторов. Однако в этих руководствах, да и в оригинальных статьях отечественных и зарубежных аналитиков и метрологов не обсуждается вопрос о проверке методик определения суммарного содержания однотипных веществ. А ведь проверка методик группового анализа и выявление систематических погрешностей в случае использования интегральных показателей должны существенно отличаться от обычных процедур такого рода. Прежде всего, надо понять, что выбрать в качестве опорного значения, характеризующего измеряемую величину. К сожалению, в распоряжении аналитика во многих случаях нет стандартных образцов с аттестованным суммарным содержанием однотипных органических веществ, нет и аттестованных методик измерения интегральных показателей. Поэтому на практике значения ИП просто сопоставляют друг с другом. Например, в статье [104] антиоксидантную активность разных образцов чая, найденную методом FRAP в пересчете на один стандарт, сопоставляли с показателем «суммарное содержание полифенолов по Фолину–Чиокальтеу», выраженным в пересчете на другой стандарт. Обнаруженную линейную корреляцию авторы посчитали подтверждением правильности измерения показателя AOA FRAP, что, конечно же, абсурдно с точки зрения метролога. Сходные аргументы приведены в работах [6; 96].

Если принять приведенную в разделе 2.2. дефиницию интегральных показателей и считать их приближенными оценками суммарных содержаний однотипных веществ, то появляются опорные значения, необходимые для оценки погрешностей. В частности,

приготовив модельные смеси, содержащие известные количества нескольких веществ, определив значения ИП этих смесей по проверяемой методике и сопоставляя их с известными значениями c_{Σ} , можно рассчитать относительную погрешность результатов анализа по формуле (2.1) [36; 85]. Однако этот подход имеет ряд ограничений. Прежде всего, результат проверки зависит от того, какие вещества выбраны для конструирования модельных смесей. Возможно, для одних смесей методика дает правильные результаты, а для других – неправильные. Неясно, сколько компонентов должны содержать подобные смеси, каким должно быть соотношение их концентраций, сколько всего таких смесей надо проверить в ходе проверки. К тому же правильность анализа модельной смеси не докажет правильности анализа реального объекта, поскольку во втором случае проявляется влияние посторонних веществ.

Для проверки правильности анализа реального объекта найти опорное значение измеряемой величины гораздо труднее. Возникает идея использовать для этого некоторую референтную методику, включающую хроматографическое разделение аналитов. Действительно, эту идею не раз использовали, пытаясь подтвердить правильность экспрессных методик анализа неразделенных смесей. Но следует учесть, что таким образом мы сравниваем разные физические величины, причем зачастую они характеризуют разные группы однотипных веществ и выражены в пересчете на разные стандарты. Так, ИК-спектрометрическим методом [21] оценивают суммарное содержание всех УВ, присутствующих в питьевой воде, в пересчете на смесь Симарда, а хроматографическим методом [105] (он считается референтным) – углеводов от C_8 до C_{40} в пересчете на дизельное топливо. Аналитикам понятно, что расхождение результатов, полученных по методикам [21] и [105], нельзя считать погрешностью оценки суммарного содержания УВ в воде. И наоборот, совпадение результатов не докажет правильность проверяемой экспрессной методики, хотя будет сильным аргументом в пользу такого заключения.

Сравнительно недавно начат выпуск стандартных образцов с аттестованным суммарным содержанием углеводов. Смесь разных УВ в некоторых из этих образцов находится в водорастворимой таблетке, и после растворения ее в дистиллированной воде получаем водный раствор с заданным суммарным содержанием УВ – имитат природной или питьевой воды. Такие имитаты очень удобны для проверки методик анализа. Причем, как правильно указано в стандарте [21], желательно использовать несколько разных ГСО. Очевидно, следует стремиться к созданию стандартных образцов и для других методик оценки суммарного содержания однотипных веществ.

Приемлемым вариантом метрологической аттестации методик оценки суммарных содержаний однотипных веществ считают также способ разбавления. Метод разбавления применен в работах [106; 107] для проверки и аттестации экспрессных методик определения антиоксидантной активности пищевых продуктов. В работе [106] показатель АОА измеряли потенциометрическим методом с применением феррицианидной медиаторной системы. Измерение АОА каждого образца проводили дважды – без разбавления и после разбавления пробы в два раза. Затем рассчитывали обычный набор метрологических характеристик методики (показатели повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности). Показатели правильности, вычисленные для разных концентрационных диапазонов, не превышали 21 %.

Аналогичным образом в работе [107] была проведена метрологическая аттестация спектрофотометрической методики определения АОА FRAP в пересчете на аскорбиновую кислоту. Авторы придерживались требований ГОСТ Р ИСО 57025-2002. Опорным значением считали АОА пробы, разбавленной в 100–500 раз, поскольку результаты измерения АОА неразбавленных проб искажены матричными эффектами. Единственные вопросы, возникающие в связи с этими работами – а все ли систематические погрешности учитывает подобный способ проверки? Можно ли считать значение АОА разбавленного раствора действительным значением измеряемой концентрации однотипных веществ?

Для проверки правильности оценки суммарного содержания однотипных веществ нередко применяют способ стандартных добавок («введено-найдено»). Однако делается это, как правило, не совсем корректно. Так, методику измерения углеводородного индекса природных вод [108] предлагается проверять, сопоставляя результаты анализа с известной добавкой стандартной углеводородной смеси (смесь Симарда) и без такой добавки. Это правильно, но не исключено, что добавки других углеводородов будут определяться менее точно, чем добавки $X_{ст}$. Очевидно, следовало бы проводить проверку с использованием нескольких добавок, различающихся по своему качественному составу.

2.4.2. Источники систематических погрешностей

Способ оценки c_{Σ} с помощью ИП следует выбирать с учетом того, какие факторы могут вызвать отклонения результата измерения ИП (c^*) от c_{Σ} и насколько велики ожидаемые отклонения [36]. Независимо от того, содержание какой именно группы однотипных веществ характеризует данный интегральный показатель, выявленное в эксперименте отличие c^* от c_{Σ} может быть вызвано следующими причинами:

- 1) случайные погрешности измерений;
- 2) потери аналитов в ходе пробоподготовки;
- 3) влияние посторонних веществ на величину обобщенного аналитического сигнала;
- 4) разная чувствительность определения однотипных аналитов (включая $X_{ст}$) по выбранной методике (обычно это наиболее важный фактор);
- 5) неаддитивность обобщенного аналитического сигнала;
- 6) неудачный выбор стандартного вещества.

Естественно, в реальных условиях действуют все перечисленные факторы, а также, иногда, некоторые другие, однако влияние одного или двух факторов из вышеприведенного списка обычно превалирует. Далее будет рассмотрено влияние первых трех факторов в вышеприведенном списке. Обычно оно менее

значимо, чем влияние других, которые будут детально рассмотрены в следующих главах.

Случайные погрешности при измерении обобщенного аналитического сигнала, как правило, невелики. Обычно они характеризуются значениями коэффициента вариации (W), не превышающими 2–3 % для чисто спектрометрических методов и 3–5 % для методов, включающих проведение фотометрических или электродных реакций. Источники случайных погрешностей и способы их снижения для каждого метода те же, что и при определении индивидуальных соединений. Поскольку последние хорошо изучены и общеизвестны, рассматривать здесь источники и способы уменьшения случайных погрешностей нет необходимости. Важно, что общая погрешность оценки c_{Σ} с помощью интегральных показателей обычно составляет десятки (а то и сотни!) процентов, т. е. гораздо выше уровня случайных погрешностей. Примером могут быть результаты определения суммы углеводов в модельных смесях (табл. 2.7).

Таблица 2.7

Результаты ИК-спектрометрического анализа смесей углеводов

<i>Состав смеси</i>	<i>Отношение концентраций</i>	c_{Σ} , мг/дм ³	c^* , мг/дм ³	W , %	δc , %
н-Гексан, толуол	3:1	102	99	3	–3
	1:1	99	68	0,5	–31
	1:3	101	44	1	–57
Толуол, циклогексан	3:1	101	66	0,1	–35
	1:1	104	121	3	16
	1:3	102	180	0,3	77
Толуол, н-гексан, циклогексан	3:1:1	101	77	2	–23
	1:1:1	94	119	2	26
	1:2:3	97	159	1	64

Примечание. Измерения проведены на фурье-спектрометре ФТ-801 при 2930 см^{–1}. Растворитель – ССl₄.

Видно, что в общей неопределенности оценки суммарного содержания углеводов основную роль играет систематическая составляющая, а случайными погрешностями можно пренебречь. Аналогичные выводы были получены в результате анализа данных по другим интегральным показателям, используемым при определении суммарных содержаний фенолов, белков, антиоксидантов фенольного типа и других групп однотипных веществ.

Потери аналитов в ходе пробоподготовки. Это, несомненно, более значимый фактор, чем случайные погрешности измерений. Систематические погрешности, вызванные действием этого фактора, всегда отрицательны. В некоторых случаях неполнота извлечения однотипных аналитов из пробы или потери аналитов в ходе последующей пробоподготовки могут стать главной причиной неточной оценки суммарного содержания аналитов [4]. Но такие случаи маловероятны по следующим соображениям:

1. Многие ИП определяют без разделения и концентрирования компонентов пробы, т. е. без длительной и трудоемкой пробоподготовки, чреватой потерями аналитов. Это относится к определению белков в биологических жидкостях, антиоксидантов в пищевых продуктах, показателей структурно-группового состава нефти и нефтепродуктов, поверхностно-активных веществ, а также большинства интегральных показателей третьей и четвертой групп.

2. Как правило, суммарные содержания однотипных веществ не определяют на концентрационных уровнях ниже 10^{-6} М. С другой стороны, потери аналитов становятся неизбежными, когда вещества надо определять на уровне 10^{-7} – 10^{-10} М [16]. В частности, при раздельном определении канцерогенных полиаренов, диоксинов, афлатоксинов, пестицидов, компонентов химического оружия, следов наркотиков и допинга, а также диагностических маркеров. Опасность потерь аналитов в ходе пробоподготовки связана именно с этой сферой, а не с оценкой суммарных содержаний белков, нефтепродуктов, антиоксидантов и т. п.

При определении суммарного содержания однотипных веществ с помощью ИП сумму этих веществ выделяют далеко не всегда. Такие случаи немногочисленны и довольно хорошо изучены. Следует назвать экстракционное или сорбционное извлечение фенолов, углеводов и тяжелых металлов из природных или сточных вод, отгонку летучих фенолов и сорбционное отделение мешающих веществ. Проверка показала, что в перечисленных выше случаях потери анализов могут достигать до 50 %, что соответствует данным других исследователей. Примером может быть экстракционное извлечение углеводов (УВ) галогенсодержащими растворителями. Степень извлечения УВ при однократном установлении равновесия существенно варьирует в зависимости от типа УВ: для алифатических УВ она обычно превышает 85 %, а для легких аренов составляет 20–40 % [57]. Обычно экстракцию повторяют три раза, а экстракты объединяют, однако даже такое усложнение методик не позволяет полностью исключить потери, связанные с неполнотой извлечения УВ. Следует также обратить внимание, что состав смеси УВ в результате экстракции и других операций меняется. Теряются не только легкие арены, но и полиарены, которые сорбируются оксидом алюминия в ходе традиционной очистки экстракта от окисленных (неуглеводородных) компонентов. При извлечении отдельных групп УВ можно подбирать наиболее подходящий растворитель. Так, при определении полиаренов их рекомендуется извлекать бензолом. Тяжелые алифатические углеводороды извлекают *n*-гексаном, изооктаном и петролейным эфиром. Наибольшую степень извлечения дает *n*-гексан, однако он не полностью извлекает углеводороды, сорбированные на частицах взвеси. Для таких частиц характерно обволакивание их поверхности малорастворимыми окисленными соединениями (смолы, асфальтены и др.).

Потери фенолов в ходе пробоподготовки обычно связаны с их неполной отгонкой из пробы воды и окислением части фенолов кислородом воздуха [64]. В последние годы быстро развиваются способы извлечения фенолов всевозможными сорбентами,

особенно модифицированными кремнеземами (см. обзор [109]). Судя по литературным данным, в условиях выделения суммы фенолов из природных вод по традиционно применяемым методикам отгонки или экстракции потери могут достигать до 30 %, а по новым методикам твердофазной экстракции или сорбции – до 10 % отн. Однако эти данные преимущественно характеризуют извлечение индивидуальных фенолов из однокомпонентных модельных растворов, тогда как при совместном присутствии разных фенолов и других веществ возможно как увеличение, так и снижение потерь (синергетические эффекты). Хорошим вариантом учета потерь в ходе пробоподготовки и повышения точности анализа является использование метода добавок, но величина потерь сильно зависит от природы аналита, поэтому добавки должны содержать смеси однотипных веществ того же типа, что и смеси аналитов в исследуемых объектах.

2.5. Влияние посторонних веществ на величину интегрального показателя

Термин «посторонние вещества» следует понимать как общее название веществ, которые не входят в группу определяемых (однотипных) веществ, могут находиться в пробе совместно с этими веществами и способны повлиять на их обобщенный сигнал. Далее любые посторонние вещества обозначаются символом Z . По-видимому, можно выделить четыре группы посторонних веществ, с учетом механизма их влияния на сигнал аналитов:

1. *Вещества, формирующие такие же сигналы*, как аналиты, например оптическую плотность раствора при той же длине волны. Сигналы Z налагаются на обобщенный сигнал аналитов. После пересчета на содержание $X_{ст}$ величина ИП окажется завышенной.

2. *Вещества, не создающие собственный аналитический сигнал в области регистрации сигнала аналитов, но взаимодействующие с аналитами* так, что концентрация и/или сигнал аналитов снижаются или полностью исчезают. После пересчета сигнала

аналитов на содержание стандарта величина ИП окажется заниженной.

3. Вещества, не создающие собственный сигнал в области регистрации сигнала аналитов и не реагирующие с аналитами непосредственно, но *взаимодействующие с реагентом*, участвующим в формировании аналитического сигнала. В присутствии этой группы Z аналитический сигнал должен снижаться, величина ИП – тоже.

4. Вещества, которые *катализируют или ингибируют формирование обобщенного аналитического сигнала*. При недостаточном времени экспозиции эти вещества также могут привести к систематической погрешностям при измерении ИП.

Рассмотрим в качестве примера влияние разных Z на величину интегрального показателя АОА FRAP. Как уже отмечалось в разделе 1.4, метод FRAP основан на восстановлении реагента – железа(III) полифенолами в присутствии лигандов R , дающих окрашенные комплексы с ионами Fe^{2+} . Такими лигандами могут быть, например, трипиридилтриазин, *о*-фенантролин или 2,2'-дипиридил. Возникающий аналитический сигнал (A_{Σ}) измеряют в видимой области спектра через τ минут после смешивания растворов. Показатель АОА FRAP (c^* , мкМ) находят по градуировочному графику, построенному по растворам $X_{ст}$ (кверцетин, галловая или аскорбиновая кислота). При большом избытке $Fe(III)$ сигналы полифенолов аддитивны, поэтому по измеренной величине АОА можно судить о суммарном содержании полифенолов (c_{Σ}) [6; 73; 85; 104 и др.]. В ходе анализа реальных объектов полифенолы от матрицы не отделяют. Поэтому очень важно понять, какие вещества и каким именно образом могут повлиять на величину данного интегрального показателя. Влияние разных Z на точность оценки c_{Σ} ранее специально не изучалось. Для снижения матричных эффектов предложено заранее разбавлять пробу в 100–200 раз [98; 107], но этот прием, необходимый в анализе красных сухих вин, не удастся применять в анализе продуктов с низким содержанием полифенольных антиоксидантов.

Очевидно, **эффекты первого типа**, ведущие к наложению сигналов и получению завышенных результатов анализа, следует ожидать от веществ, присутствующих в пробе и интенсивно поглощающих свет в видимой области, однако это влияние легко исключить, используя раствор пробы в качестве раствора сравнения. Аналогичное влияние будут оказывать присутствующие в пробе бесцветные вещества, не входящие в группу антиоксидантов, но способных восстановить железо(III) в слабокислой среде. Эти вещества придется заранее отделять или маскировать. Примером могут быть сульфиды или альдегиды. Некоторые органические соединения, не обладающие антиоксидантными свойствами *in vivo*, формируют слабую окраску при гораздо более высоких концентрациях, чем антиоксиданты фенольного типа. Так, сигнал цитрата натрия (Na_3Cit) возникает на уровне $n \cdot 10^{-4}$ М, а сигнал альбумина – на уровне 0,05 %. От этого влияния легко избавиться путем разбавления пробы.

Эффекты второго типа могут вызвать вещества, прямо реагирующие с антиоксидантами, в частности с полифенолами. Такой эффект, в частности, проявляют белки – альбумины, глобулины и особенно казеины молока. Их влияние было изучено Л.А. Карцовой (метод капиллярного электрофореза) [110] и Г.К. Зиятдиновой [111] (электрохимические методы). В системах «казеин – галловая кислота», «казеин – катехин» и в некоторых других выявлено образование прочных комплексных соединений, не восстанавливающих железо(III) или восстанавливающих его очень медленно. В любом случае это снижает аналитический сигнал смеси антиоксидантов. При определении полифенолов по методу FRAP белки (в частности альбумины) также снижает обобщенный сигнал, причем тем сильнее, чем выше концентрация белков [112]. Возникающая систематическая погрешность может составлять десятки процентов (табл. 2.8). Интересно, что немедленное связывание антиоксидантов происходит даже при обычном добавлении молока в чай или кофе. Возможно, для кого-то это улучшает вкус соответствующих напитков, но их ценность как источника природных антиоксидантов явно снижается.

Таблица 2.8

Влияние некоторых Z на результаты определения показателя AOA методом FRAP. Анализируемая смесь – KB+ГК (1:1), $c_{\Sigma} = 4,15$ мкМ [112]

<i>Z</i>	<i>c_Z</i> , мкМ	<i>АОА_Z</i> , мкМ	δc_Z^* , %
—	—	$5,16 \pm 0,17$	0
Альбумин	0,03%	$1,84 \pm 0,10$	–64
NaF	71,5	$4,72 \pm 0,07$	–8
	715	$1,33 \pm 0,16$	–74
	7150	АОА не определяется	
Na ₃ Cit	42	$4,21 \pm 0,15$	–18
	420	$0,26 \pm 0,19$	–95
	4200	АОА не определяется	
Na ₃ PO ₄	79	$1,61 \pm 0,03$	–69
	237	$1,17 \pm 0,04$	–77
	2370	$0,40 \pm 0,03$	–92

Примечание. АОА_Z – антиоксидантная активность, определенная в присутствии Z (стандарт – ГК).

Эффекты третьего типа почти не изучены. Было замечено, что при определении показателя AOA FRAP развитие окраски прекращается при введении в раствор фторидов. С полифенолами и другими антиоксидантами они не реагируют. Специальное исследование показало, что чувствительность определения полифенолов снижается не только в присутствии фторидов, но и фосфатов, цитратов, тартратов и других веществ-комплексантов, не формирующих собственные аналитические сигналы, но связывающих реагент (ионы Fe³⁺) в прочные и бесцветные комплексные соединения. Влияние комплексантов можно прогнозировать, рассчитывая закомплексованность Fe(III) с учетом концентрации лиганда и значения pH.

Увеличение исходной концентрации реагента до 10^{–3} М несколько снижает влияние фторидов, но приводит к побочным

процессам с участием фосфатов и салицилатов. Связывание Fe^{3+} комплексообразователями приводит к возникновению мультипликативной систематической погрешности и в ходе анализа модельных смесей по заранее построенному (в отсутствие Z) градуировочному графику. Величина интегрального показателя оказывается сильно заниженной. Переход к определению АОА модельных смесей по способу добавок значительно уменьшает влияние комплексообразователей (табл. 2.9).

Таблица 2.9

**Результаты анализа некоторых пищевых продуктов
по градуировочному графику (А) и по способу добавок (Б) [112]**

Продукт и торговая марка	Разбав- ление	Объем аликвот, см^3	АОА, мМ, в пересчете на ГК		W, %	
			А	Б	А	Б
Вино красное сухое Cabernet-Merlot	1:100	2,0	$10,6 \pm 0,6$	$12,5 \pm 0,9$	2,0	3,0
Вино белое полусладкое Lieb Arau Liedlein	1:100	2,0	$6,2 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,1$	1,8	1,6
		4,0	$5,2 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,4$	1,5	2,6
Вино красное сухое «Каберне»	1:100	4,0	$6,3 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,1$	1,5	0,6
Настой чая черного (листового) Ahmad tea	1:100	2,0	$3,9 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,3$	3,0	3,0
Настой чая черного (листового) Lipton	1:100	4,0	$3,4 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,5$	4,6	4,9
Сок яблочный J7	—	1,5	$0,44 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,04$	0,9	2,3
Пиво светлое Carlsberg	—	1,0	$0,28 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,06$	2,5	4,6

Анализ пищевых продуктов, содержащих комплексанты на уровне 10^{-4} М и выше, также рекомендуется проводить по способу добавок, что ведет к более высоким (на 20–50 %) значениям АОА, чем при использовании традиционных методик анализа тех же продуктов с применением градуировочных графиков. Для большинства исследованных продуктов различия результатов анализа статистически достоверны. Приблизительная правильность результатов анализа пищевых продуктов по разработанным методикам подтверждена по способу «введено – найдено».

Конечно, влияние комплексантов, содержащихся в пищевых продуктах, на результаты определения АОА проявляется только при достаточно высокой концентрации Z ($> 10^{-5}$ М в конечном разбавлении). Если известно, что анализируемый продукт содержит очень мало комплексантов или вовсе не содержит их, применять трудоемкий способ добавок нецелесообразно. Правильные значения АОА можно получить и по градуировочному графику. С другой стороны, даже применение способа добавок не может гарантировать правильную оценку суммарного содержания полифенолов в пищевых продуктах, поскольку для этого надо устранить основную составляющую общей неопределенности, связанную с разной чувствительностью определения индивидуальных полифенолов.

Эффекты последнего **четвертого типа**, связанные с каталитическим или ингибирующим действием посторонних веществ на формирование обобщенного аналитического сигналов антиоксидантов при оценке их суммарного содержания по методу FRAP пока что не выявлены. Однако это не означает, что такие эффекты не будут обнаружены в дальнейшем. Разработка новых методик оценки суммарного содержания обязательно должна включать стадию проверки влияния разных Z на результаты анализа.

Глава 3

ВНУТРИГРУППОВАЯ СЕЛЕКТИВНОСТЬ АНАЛИТИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ КАК ИСТОЧНИК НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ ИНТЕГРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

3.1. Внутригрупповая селективность аналитических сигналов

3.1.1. Роль и количественная оценка внутригрупповой селективности

Для любой группы однотипных веществ можно построить набор градуировочных зависимостей вида $I_i = k_i c_i$, где I_i – сигнал единичного аналита X_i в условиях, выбранных для измерения обобщенного сигнала всех аналитов данной группы. Таким образом, градуировочные функции разных X_i получают в одинаковых условиях по одной и той же методике. Символом k_i обозначим коэффициент чувствительности при определении любого X_i ; символом c_i – содержание единичного X_i в конечном разбавлении.

Назовем различие значений k_i при определении однотипных веществ по данной методике *внутригрупповой селективностью сигналов*. Наглядным выражением селективности являются «вееры градуировок» [113]. Примером может быть веер, показанный на рис. 3.1 и характеризующий внутригрупповую селективность спектрофотометрического определения антиоксидантов фенольного типа по методу FRAP. Вид веера зависит от состава группы, способа измерения сигналов и способа выражения концентрации аналитов.

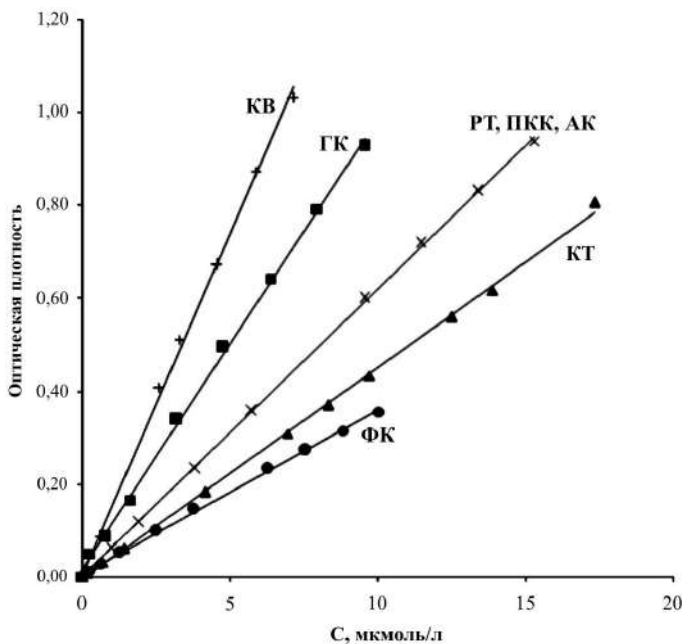


Рис. 3.1. Градуировочные графики для спектрофотометрического определения разных фенольных антиоксидантов с использованием индикаторной системы $Fe(III) - 2,2'$ -дипиридил. Сигналы получены по методике [73] на приборе КФК-3-01; $\lambda = 520$ нм, $l = 2,0$ см

«Вееры градуировок», аналогичные приведенному на рис. 3.1, можно получить и при кондуктометрическом определении сильных электролитов, и при рефрактометрическом определении моносахаридов, и при флуориметрическом определении полиаренов, и во многих других случаях, но чаще всего их наблюдают в спектрофотометрическом анализе. Разная чувствительность спектрофотометрического определения однотипных веществ обычно связана с различием структуры молекул. Однако веер, показанный на рис. 3.1, отличается тем, что при определении разных антиоксидантов образуется один и тот же продукт — окрашенный комплекс железа(II) с 2,2'-дипиридилем. И, тем не менее,

веер наблюдается и здесь, так как коэффициенты чувствительности при определении разных антиоксидантов не совпадают; различия в чувствительности вызваны разной стехиометрией и разной скоростью взаимодействия индивидуальных антиоксидантов с реагентом – ионами железа(III) [73; 85].

Внутригрупповая селективность сигналов имеет большое практическое значение. Именно она определяет возможность точной оценки суммарного содержания веществ данной группы в пересчете на стандартное вещество. Степень селективности сигналов следует учитывать, сравнивая разные методики или оптимизируя любую из них. Внутригрупповая селективность важна и для раздельного определения однотипных веществ, только в этом случае мы заинтересованы не в снижении, а в максимальном повышении этой селективности.

Установим количественную характеристику внутригрупповой селективности. Для этого можно было бы измерить ширину веера в градусах [113], но на результат повлияет выбор масштаба на координатных осях. Значительно более объективная и устойчивая характеристика селективности предложена в работе [114] – это безразмерный параметр T :

$$T = K_m / K_1, \quad (3.1)$$

где K_m и K_1 – максимальный и минимальный коэффициенты чувствительности в генеральной совокупности, включающей все анализы данной группы (m аналитов). Эти коэффициенты должны быть измерены по методике, выбранной для измерения обобщенного сигнала. Найти T можно опытным путем, по значениям K_i , характеризующим представительную выборку, включающую n аналитов ($n < m$). При $n \rightarrow m$ выборочный параметр $T_{\text{эксп}}$ стремится к T . Теоретически параметр T может принимать любые значения в интервале от единицы до бесконечности. Реально встречаются значения T от 1,2 (рефрактометрия углеводов [115]) до 300 (определение суммы белков по методу Лоури [5]). Развитие методов оценки суммарных содержаний означает постепенную замену более селективных методик менее селективными ($T \rightarrow 1$), что

повышает точность оценки. В частности, эта тенденция отчетливо проявляется применительно к методам определения суммарного содержания белков в биологических жидкостях.

Значения параметра T лучше всего определять путем эксперимента, но в некоторых случаях можно использовать справочные данные по коэффициентам чувствительности. Например, по табличным значениям подвижности разных ионов в разбавленных водных растворах нетрудно рассчитать коэффициенты чувствительности для кондуктометрического определения разных солей. Затем можно сопоставить значения коэффициентов чувствительности, выбрать K_m и K_1 , а по ним рассчитать T . К сожалению, таблицу молярных коэффициентов светопоглощения разных веществ использовать для расчета T не удастся, так как в таких таблицах обычно приводят значения коэффициентов поглощения *при разных длинах волн* (в максимумах светопоглощения соответствующих веществ).

Экспериментальной оценке параметра T иногда мешает нехватка реактивов и/или трудоемкость соответствующих измерений. Эти препятствия можно преодолеть, рассчитывая коэффициенты чувствительности труднодоступных соединений статистическими методами (см. подраздел 3.1.3) или методами квантовой химии.

3.1.2. Причины разной чувствительности определения однотипных веществ

Чтобы выбрать лучшую методику оценки c_Σ или оптимизировать известную методику, надо понять, почему однотипные вещества определяются с разной чувствительностью. Ограничимся применяемым чаще всего способом оценки c_Σ – спектрометрическими измерениями в видимой, УФ- или ИК-области спектра. В этом случае возможны, как минимум, три причины внутригрупповой селективности, а именно:

А) Неверный выбор сигнала и внутренняя неоднородность группы.

Б) Сдвиги полос поглощения при изменении структуры молекул.

В) Разная стехиометрия взаимодействия разных аналитов с реагентом и/или разная скорость соответствующих реакций.

Рассмотрим эти эффекты по очереди.

А) Если в качестве обобщенного сигнала использовать свойство, присущее не всем, а только части веществ данной группы, то параметр T будет бесконечно большим (деление на 0), а результат анализа – сильно отличающимся от действительного содержания аналитов. Примером могут быть два известных способа определения суммарного содержания углеводов в природных и сточных водах: по поглощению света в УФ-области спектра [116] и по интенсивности флуоресценции [117]. Известно, что далеко не все УВ поглощают свет в УФ-области и лишь немногие УВ при этом флуоресцируют. Такое явление характерно лишь для аренов. Получить правильную оценку суммарного содержания всех УВ по таким методикам можно только в том редком случае, когда априорно неизвестная доля аренов в исследуемой пробе совпадет с долей аренов в применяемом стандарте. Неудивительно, что указанные методики дают систематические погрешности, достигающие до 350–500 % отн. [3; 12]. Однако УФ-спектрометрия и флуориметрия дают вполне приемлемые результаты, если надо оценить суммарное содержание именно ароматических углеводов. То, что в практике гидрохимического анализа указанные методы применяют для измерения интегрального показателя «нефтепродукты», то есть для оценки суммарного содержания всех УВ – можно объяснить лишь простотой аппаратуры и высокой чувствительностью методик, а также низкими требованиями к правильности результатов анализа. Невольно вспоминаются поиски потерянной монетки под фонарем, где ее не теряли, но где ее искать гораздо удобнее.

По поглощению пробы в ИК-области (при 3,3–3,5 мкм) суммарное содержание всех УВ определяют намного точнее, чем методами УФ-спектрометрии или флуориметрии. Поглощение ИК-излучения в указанной области создается С-Н связями в метильных

и метиленовых группах, а они имеются почти во всех углеводородных молекулах. Однако правилу *«сигнал должен создаваться всеми компонентами группы»* не полностью подчиняется даже ИК-спектрометрия. Дело в том, что в молекулах бензола, нафталина и некоторых других аренов метильных и метиленовых групп нет; соответствующие соединения в указанной области длин волн ИК-излучение почти не поглощают (см. рис. 3.3 на с. 109). Это явление ведет к систематическим погрешностям анализа, тем большим, чем выше доля указанных аренов в углеводородных смесях. Свой вклад в общую погрешность ИК-спектрометрической оценки суммарного содержания углеводородов вносят и некоторые другие факторы, поэтому общая погрешность составляет 30–50 % [12; 58]. Меняя условия ИК-спектрометрического определения углеводородов, можно добиться и лучших результатов.

Приведенный пример показывает, что **при определении суммарного содержания группы веществ не следует использовать в качестве обобщенного сигнала свойства, присущие лишь части этих веществ.** Если «универсальный» сигнал найти не удастся, лучше использовать «двухступенчатую» схему определения c_{Σ} . Примером может быть известная методика определения суммарного содержания УВ в водах [118]. Вначале определяют сумму алканов и циклоалканов по поглощению экстракта в ИК-области. Затем определяют сумму аренов – по поглощению того же экстракта в УФ-области. Найденные значения концентраций складывают. Отметим, что если для оценки общего содержания анализов приходится складывать разные интегральные показатели, они должны быть найдены в пересчете на одну и ту же стандартную смесь, и такие смеси специально разрабатываются [119].

Раздельное определение составляющих неоднородной группы можно использовать и для точной оценки суммарного содержания антиоксидантов. В структурном отношении эта большая группа веществ очень неоднородна, и ни одна из многочисленных методик оценки антиоксидантной активности не является «универсальной». Например, метод FRAP дает довольно точные ре-

зультаты для антиоксидантов фенольного типа, но не пригоден для определения тиолов. Их придется определять другим способом, а затем, если потребуется оценка общего содержания всех антиоксидантов, складывать полученные результаты. В литературе неоднократно обсуждалась идея отдельного определения ЕТ- и НАТ-антиоксидантов [120], а также гидрофильных и липофильных антиоксидантов. Однако надежные и метрологически аттестованные методики такого типа пока что не появились.

Б) Второй причиной резкого различия коэффициентов поглощения однотипных аналитов могут быть сдвиги полос поглощения в их спектрах. Этот фактор действует и в тех случаях, когда свой вклад в обобщенный сигнал вносят все аналиты данной группы. Сдвиги полос не приводят к таким большим погрешностям оценки c_{Σ} , как рассмотренное в предыдущем разделе применение селективных сигналов для анализа внутренне неоднородных групп. Однако сдвиги полос тоже мешают получению точных оценок c_{Σ} .

Сопоставление эталонных спектров поглощения однотипных веществ в УФ-области показывает, что при переходе от одного аналита к другому (структурному аналогу первого) форма спектральной кривой, площадь под спектральной кривой и даже высота пика при λ_{\max} меняются незначительно, наблюдается лишь небольшой рост молярного коэффициента поглощения при утяжелении молекулы и удлинении цепи сопряжения. Однако появление нового заместителя (ауксохрома) или замена одного заместителя другим приводят к достоверному сдвигу пика по оси абсцисс. В частности, появление нового заместителя обычно приводит к батохромному сдвигу [24]. В свою очередь, даже небольшие сдвиги пиков по абсциссе приводят к существенным изменениям коэффициентов поглощения на любой фиксированной длине волны, особенно в случае узкополосных спектров [121]. Примером могут быть коэффициенты чувствительности однотипных производных фенола и его гомологов при фиксированной длине волны (табл. 3.1). В видимой области они различаются примерно в 3 раза.

В УФ-области спектральные сдвиги проявляются слабее, параметр T для той же выборки фенолов меньше. Поэтому переход к определению фенолов в УФ-области позволяет повысить точность оценки их суммарного содержания [66]. Незначительные сдвиги полос поглощения при переходе от одного аналита к другому наблюдаются и в ИК-области, несмотря на то, что сигналы формируются там одними и теми же межатомными связями, например С-Н связями в метильных и метиленовых группах (табл. 3.2).

Таблица 3.1

**Коэффициенты чувствительности
при спектрометрическом определении разных фенолов
в виде однотипных азокрасителей [114]**

<i>Аналит</i>	<i>Значения K_i, $10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$</i>		
	<i>410 нм</i>	<i>450 нм</i>	<i>490 нм</i>
Фенол	17,2	16,9	7,8
о-Крезол	14,0	16,4	11,3
м-Крезол	15,8	13,7	8,8
Резорцин	13,3	10,7	6,4
Нафтол	6,4	5,0	3,8
$T_{\text{эксп}}$	2,69	3,38	2,97

Таблица 3.2

**Удельные коэффициенты поглощения (K_i , л/г·см)
некоторых УВ в ИК-области**

<i>Аналит</i>	<i>В отсутствие растворителя (данные [122]) *</i>	<i>В среде CCl_4 (данные [123])</i>	
		<i>FT-801 **</i>	<i>ИКН-025 ***</i>
Циклогексан	5,82	6,02	2,34
н-Тетрадекан	4,57	6,52	2,60
н-Декан	3,94	6,08	2,45
Изооктан	3,81	2,72	2,28
н-Гексан	3,28	3,02	2,55

* При 2926 см^{-1} .** При $\nu = 2930 \text{ см}^{-1}$.

*** В области 3,3–3,5 мкм.

Как видно из табл. 3.2, удельные коэффициенты поглощения разных алканов и циклоалканов, измеренные в одинаковых условиях на одной и той же длине волны, достоверно различаются. Веер градуировок, построенный для выборки, включающей 10 алканов, циклоалканов и алкиларенов, весьма широк (при 2930 см^{-1} $T \approx 16$). Еще большие различия коэффициентов поглощения наблюдаются при других значениях волновых чисел. При переходе от одноволновой ИК-спектрометрии (прибор FT-801) к ИК-фотометрии (прибор ИКН-025) различия коэффициентов поглощения снижаются ($T \approx 7,3$), поскольку во втором случае сдвиги полос поглощения происходят внутри узкого интервала длин волн, в котором измеряется усредненная оптическая плотность раствора аналита (рис. 3.3).

Снизить внутригрупповую селективность, возникающую из-за спектральных различий однотипных аналитов, трудно, но такие способы существуют. Прежде всего, можно эмпирически подбирать длины волн, на которых селективность сигналов проявляется в наименьшей степени. Параметром оптимизации должна быть величина T . Таким же образом можно варьировать природу или концентрацию реагента, величину pH и др. Параметр T можно также снизить, переходя от одноволновой ИК-спектрометрии к ИК-фотометрии [123] или многоволновой ИК-спектрометрии [21; 101; 124]. Эти способы рассмотрены в главе 5.

В) Третья причина внутригрупповой селективности связана с проведением фотометрических реакций. Как видно из рис. 3.1, вееры градуировок образуются даже в тех случаях, когда все аналиты одинаково реагируют и образуют продукты с близкими спектральными свойствами, даже тот же самый продукт. Дело в том, что выход продукта реакции за фиксированное время экспозиции при прочих равных условиях зависит от стехиометрии реакции, а также от скорости взаимодействия аналита с реагентом. Разная стехиометрия и разная скорость взаимодействия разных аналитов с одним и тем же реагентом приводят к различному выходу фотометрируемых продуктов, а следовательно – к различным коэффициентам

чувствительности. По-видимому, впервые с этим эффектом столкнулись специалисты, определявшие антиоксиданты методом FRAP [94; 125]. Было обнаружено, что молекулы АО, имеющие большее число фенольных групп, в ходе реакции с железом(III) отдают большее число электронов. При этом образуется большее число молекул окрашенного продукта, например фенантролинатного или дипиридилного комплекса железа(II). Именно поэтому «пятиэлектронный» кверцетин при прочих равных условиях определяется с намного большей чувствительностью, чем одно- или двухэлектронные восстановители. «Стехиометрическое» объяснение разной чувствительности определения АО подтверждается сближением их градуировочных графиков при переходе к выражению концентраций АО в моль-экв/л [73]. На коэффициенты чувствительности влияют и некоторые другие факторы. В частности, эти коэффициенты зависят от скоростей окисления АО, поскольку за время экспозиции равновесие реакции установиться не успевает.

Причины внутригрупповой селективности не сводятся к трем основным, описанным в данном разделе. В частности, коэффициенты чувствительности могут существенно различаться при неудачно выбранном способе выражения концентрации. В некоторых случаях причины возникновения внутригрупповой селективности недостаточно изучены. Неясно, почему так сильно (вплоть до $T = 300$) различаются коэффициенты чувствительности при определении разных белков. Вероятной причиной является неспособность реагентов связывать некоторые белки. Так, кумасси бромфеноловый синий реагирует только с альбуминами [5; 126], а реактив Фолина — только с белками, содержащими аминокислотные остатки тирозина и триптофана [86].

3.1.3. Прогнозирование коэффициентов чувствительности

Для разработки методик определения суммы однотипных веществ необходимо знать коэффициенты чувствительности каждого из них в условиях измерения обобщенного сигнала. Все k_i

должны быть измерены с применением одной и той же аппаратуры и по одной методике. Табличных данных такого рода в атласах и справочниках обычно нет, а определять множество k_i опытным путем затруднительно. Зная причину возникновения внутригрупповой селективности, можно прогнозировать коэффициенты чувствительности. С этой целью могут быть использованы статистические модели.

Рассмотрим прогнозирование значений k_i на примере определения углеводов по их поглощению в ИК-области спектра. Способ прогнозирования удельных коэффициентов поглощения (K_i) по числу С-Н связей в метильных и метиленовых группах соответствующих молекул описан в статье [127]. Он включает четыре стадии.

1. **Отбор не менее 10 реперных УВ** с разными значениями n_i^* , рассчитанными по формуле:

$$n_i^* = 100 n_i / \mu_i, \quad (3.2)$$

где μ_i – молярная масса i -го УВ; n_i – число атомов Н в молекуле i -го УВ, за исключением непосредственно связанных с атомами углерода в ароматическом кольце (табл. 3.3).

Таблица 3.3

Приведенное число С-Н связей в метильных, метиленовых и метиновых группах реперных углеводов

Репер	№ репера	Формула	n_i	μ_i	n_i^*
Бензол	1	C_6H_6	0	78	0
Толуол	2	$C_6H_5CH_3$	3	92	3,26
<i>n</i> -Ксилол	3	$C_6H_4(CH_3)_2$	6	106	5,66
Кумол	4	$C_6H_5CH(CH_3)_2$	7	120	5,83
Мезитилен	5	$C_6H_3(CH_3)_3$	9	120	7,50
Циклогексан	6	C_6H_{12}	12	84	14,3
<i>n</i> -Тетрадекан	7	$C_{14}H_{30}$	30	198	15,2
<i>n</i> -Декан	8	$C_{10}H_{22}$	22	142	15,5
Изооктан	9	C_8H_{18}	18	114	15,8
<i>n</i> -Гексан	10	C_6H_{14}	14	86	16,3

Символом n_i^* здесь обозначена вспомогательная переменная «приведенное число С-Н связей». Это общее количество С-Н связей в метильных, метиленовых и метиновых группах, содержащихся в 100 г i -го углеводорода (или некоторой смеси УВ). Количество связей выражено в молях. Например, моль гексана C_6H_{14} содержит 14 молей С-Н связей и имеет массу 86 г. Соответственно, на 100 г гексана приходится 16,3 моля С-Н связей, $n_i^* = 16,3$.

2. Приготовление ряда растворов каждого репера, измерение их оптической плотности и расчет значений K_i по наклону соответствующего градуировочного графика. Исходные растворы с концентрациями порядка 140 мг/л, а также модельные смеси разных углеводородов готовили по точным навескам чистых реактивов. Оптическую плотность каждого раствора измеряли двумя способами. С помощью ИК-фурье-спектрометра ФТ-801 регистрировали спектры поглощения и измеряли оптическую плотность (A) при 3,42 мкм, используя кювету из ZnSe с толщиной слоя раствора $l = 5,00$ см. С помощью концентратомера ИКН-025 измеряли A^* – оптическую плотность, усредненную в области $(3,42 \pm 0,10)$ мкм и исправленную с учетом фонового поглощения. В этом случае использовали кювету с толщиной слоя раствора $l = 4,70$ см. Величину A^* находили по формуле $A^* = 10^{-3} \Phi$, где Φ – показания ИКН-025 по фотометрической шкале. Показания по шкале концентраций не учитывали.

3. Построение зависимости K_i от n_i^* и расчет линейной регрессии. Градуировочные графики строили по 5–7 растворам с разными концентрациями X_i при трехкратном дублировании каждого опыта. Регрессии вида $A^* = b_0 + b_1 C$ рассчитывали методом наименьших квадратов (МНК). Примером может быть метод ИК-фотометрии (прибор ИКН-025). Зависимость, показанная на рис. 3.2, аппроксимируется регрессией

$$K_i = -0,2215 + 0,1702 n_i^*. \quad (3.3)$$

Линейная корреляция n_i^* и K_i статистически значима, $r_{\text{эсп}} = 0,986$ при $r_{0,05} = 0,632$. Отметим, что при переходе к другому прибору (даже одной и той же марки) градуировку следует строить заново.

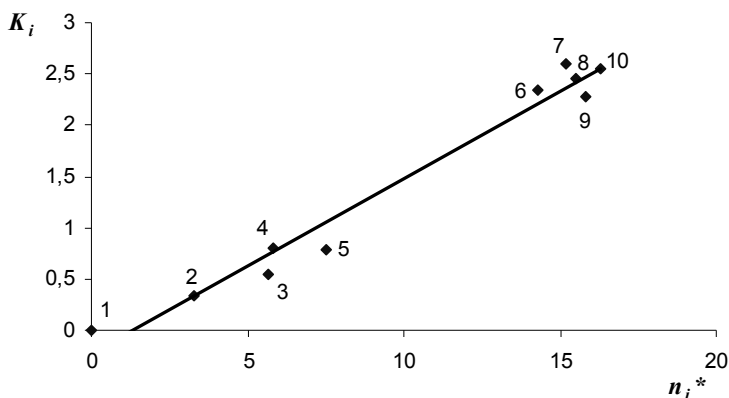


Рис. 3.2. Связь удельных коэффициентов поглощения и приведенного числа С-Н связей в молекулах УВ.
Указаны номера реперов в табл. 3.3

4. Расчет значений K_i для других УВ (не входящих в число реперных) по приведенному числу С-Н связей в их молекулах. Расчет ведут по найденному уравнению регрессии. Изложенный способ прогнозирования проверяли, используя индивидуальные УВ, не входившие в число реперных, а также их смеси. Результаты проверки приведены в табл. 3.4.

Таблица 3.4

Результаты прогнозирования удельных коэффициентов поглощения

Соединение или смесь	n_i^*	K_i , л / г см		Расхождение, % отн.
		Прогноз	Эксперимент	
Пентадекан	15,1	2,35	2,36	-0,4
Этилбензол	4,72	0,58	0,63	-7,9
Циклопентан	14,3	2,21	1,99	10
<i>n</i> -Гексан (50 %) + изооктан (50 %)	16,1	2,51	2,60	-3,5
Толуол (33 %) + <i>n</i> -ксилол (67 %)	4,81	0,60	0,67	-11
Толуол (25,7 %) + этилбензол (25,7 %) + Изооктан (25,9 %) + пентадекан (22,7 %)	9,72	1,43	1,65	-13

Погрешности прогнозирования удельных коэффициентов поглощения для индивидуальных УВ не превышали 20 % (по модулю), а в большинстве случаев были ниже 10 %. Значения K_i неуглеводородных соединений, содержащих С-Н связи (этанол, циклогексанон), прогнозировались гораздо хуже, погрешности нередко превышали 40 %. Вероятно, для неуглеводородных соединений надо использовать другие наборы реперов либо вводить дополнительные дескрипторы, отражающие влияние заместителей на величину K_i .

Прогнозирование удельных коэффициентов поглощения имеет существенное преимущество по сравнению с прогнозированием молярных коэффициентов. Удельные коэффициенты поглощения пригодны не только для индивидуальных УВ, но и для углеводородных смесей. Если вклад каждой С-Н связи в обобщенный сигнал не зависит от природы углеводорода, содержащего эту связь (т. е. сдвигами пика поглощения можно пренебречь), формула (3.3) должна описывать свойства индивидуальных углеводородов любого типа, а также их смесей, что и было подтверждено в работе [127].

Ту же выборку реперных углеводородов использовали, пытаясь создать способ прогнозирования коэффициентов поглощения для одноволновой ИК-спектрометрии (FT-801, $\nu = 2930 \text{ см}^{-1}$). В этом случае корреляционная связь между n_i^* и K_i также оказалась статистически достоверной ($r_{\text{экср}} = 0,686$ при $r_{0,05} = 0,632$), но гораздо слабее выраженной, чем при проведении измерений на концентратометре ИКН-025. Ошибки прогнозирования нередко превышали 50 %. Вероятно, наблюдающийся при 2930 см^{-1} сильный разброс точек относительно аппроксимирующей их зависимости типа (3.3) объясняется выявленными сдвигами полос поглощения для однотипных С-Н связей при переходе от одного УВ к другому. Сдвиги однотипных полос поглощения в ИК-спектрах отмечали и другие авторы (Г.Ф. Большаков, S.H. Hastings). Из-за таких сдвигов прогнозировать значения K_i по реперам в случае одноволновой ИК-спектрометрии не удается. В ИК-фотометрии

те же сдвиги происходят *внутри* диапазона длин волн, в котором усредняется оптическая плотность раствора (рис. 3.3). Они слабо влияют на усредненную величину сигнала, а следовательно, и на величину K_i .

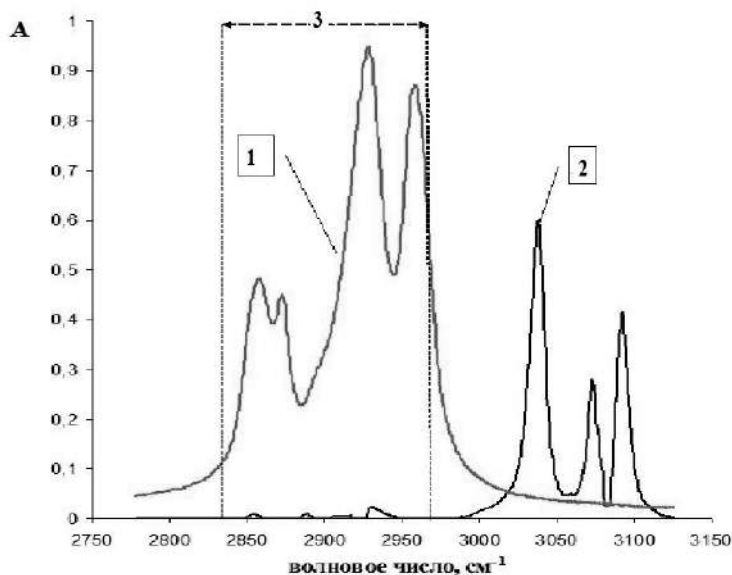


Рис. 3.3. ИК-спектры поглощения тетрахлорметановых растворов гексана (1) и бензола (2) в CCl_4 [127]. Концентрации (мг/л) – 5,46 (1) и 41,2 (2). Указан рабочий диапазон ИКН-025 (3)

Расчеты по формулам (3.2) и (3.3) показывают, что при проведении ИК-фотометрических измерений значения K_i любых УВ должны находиться в интервале от 0 до 2,8 л/г·см. Так, циклоалканы имеют общую формулу C_nH_{2n} и характеризуются одним и тем же приведенным числом С-Н связей: $n_i^* = 14,3$. Поэтому удельные коэффициенты поглощения циклоалканов должны быть близки к 2,2 л/г·см, что было подтверждено в эксперименте. Расчеты также показывают, что удельные коэффициенты поглощения алканов при использовании концентратомера ИКН-025 должны

попадать в интервал 2,2–2,8 л/г·см, что также соответствует эксперименту (табл. 3.2). Значения K_i алкилбензолов должны быть гораздо меньшими, от 0,34 л/г·см для толуола до 2,2 л/г·см для тяжелых полиалкилбензолов ($n_i \rightarrow \infty$). Увеличение доли аренов в углеводородной смеси должно приводить к снижению ее удельного коэффициента поглощения и закономерному изменению погрешности оценки c_Σ . Из (3.2) и (3.3) также следует, что по мере утяжеления молекул УВ их удельные коэффициенты поглощения должны сближаться, что облегчает выбор $X_{\text{ст}}$ и повышает точность оценки суммарного содержания тяжелых УВ.

Несомненно, изложенный выше способ статистического прогнозирования коэффициентов чувствительности (в данном случае – удельных коэффициентов поглощения алканов, циклоалканов и алкиларенов) может быть применен и в других случаях, применительно к другим свойствам и другим группам однотипных органических веществ.

3.2. Смеси известного состава: прогнозирование систематической погрешности

Как показано в главе 2, основным источником неопределенности при оценке суммарного содержания однотипных веществ в их неразделенной смеси (в пересчете на стандарт $X_{\text{ст}}$) являются различия коэффициентов чувствительности при определении этих веществ, в частности различия их молярных или удельных коэффициентов светопоглощения на аналитической длине волны, т. е. внутригрупповая селективность. Соответствующую систематическую погрешность δc находят по эмпирической формуле $\delta c_{\text{эсп}} = 100 \% (c^* - c_\Sigma) / c_\Sigma$.

Если другими источниками систематической погрешности можно пренебречь, величину δc можно прогнозировать с учетом природы стандарта, коэффициентов чувствительности и соотношения компонентов. Способы количественного прогнозирования δc ранее известны не были. Нашей задачей было разработать алго-

ритм прогнозирования δc и использовать его для оптимизации соответствующих методик анализа. Эта задача была сформулирована в статье [128], а ее решение изложено в последующих статьях: для частного случая (смесь известного состава) – в работе [85], а для общего случая (смеси произвольного состава) – в работе [114]. Рассмотрим вначале частный случай. Более сложный общий случай будет рассмотрен в разделе 3.3.

3.2.1. Используемая модель и вывод расчетных формул

В рамках данного способа значения δc прогнозируют отдельно для каждой пробы известного состава, используя следующие допущения и обозначения:

1. Известен набор присутствующих в пробе аналитов $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$, однотипных в структурном и/или функциональном отношении и формирующих обобщенный сигнал A_Σ . Концентрации аналитов (или их производных) $c_1, c_2, c_3, \dots, c_n$ выражены в одинаковых единицах (например, моль/л). Доля каждого аналита ($R_i = c_i / c_\Sigma$) в исследуемой смеси известна, но значения c_i и c_Σ неизвестны.

2. Для выбранных условий измерения сигналов известны коэффициенты чувствительности всех аналитов, обозначаемые $K_1, K_2, K_3, \dots, K_n$, причем $K_1 \leq K_2 \leq \dots \leq K_n$. Различная чувствительность определения аналитов проявляется в виде «веера» градуировочных графиков (см. ранее приведенный рис. 3.1). Когда аналиты определяют по их собственному светопоглощению, измеренному в односантиметровой кювете относительно растворителя, $K_i = \epsilon_i$, где ϵ_i – молярный коэффициент поглощения i -го аналита при выбранной длине волны. В более сложных случаях (фотометрические реакции) K_i зависит не только от молярного коэффициента поглощения соответствующего продукта, но и от стехиометрии и/или скорости реакции.

3. Оптическая плотность раствора пробы (A_Σ) – обобщенный аналитический сигнал n компонентов исследуемой смеси. Этот

сигнал линейно связан с концентрацией каждого аналита (при неизменных концентрациях остальных), аддитивен и не создается другими компонентами пробы. С учетом этих допущений обобщенный сигнал всех аналитов, присутствующих в пробе, в отсутствие случайных погрешностей должен быть равен:

$$A_{\Sigma} = \sum K_i c_i. \quad (3.4)$$

Суммирование ведем в пределах от $i = 1$ до $i = n$. Использование формулы (3.4) предполагает выполнение закона Бугера–Ламберта–Бера для каждого из аналитов и отсутствие в пробе веществ, не относящихся к искомой группе, но поглощающих свет на той же длине волны (межгрупповая селективность). Если такие вещества в пробе содержатся, они должны быть отделены или замаскированы до измерения обобщенного аналитического сигнала.

В отсутствие случайных погрешностей использование некоторого $X_{\text{ст}}$ в качестве стандартного вещества приводит к следующему результату анализа:

$$c^* = A_{\Sigma} / K_{\text{ст}} = \sum K_i c_i / K_{\text{ст}} = \sum p_i c_i, \quad (3.5)$$

где p_i – относительная величина коэффициента чувствительности i -го аналита,

$$p_i = K_i / K_{\text{ст}}. \quad (3.6)$$

Перейдем от абсолютных значений c_i к относительным, нормируя все c_i по c_{Σ} – суммарной концентрации аналитов в растворе пробы:

$$R_i = c_i / c_{\Sigma}. \quad (3.7)$$

Объединяя (3.7) и (3.5), получаем

$$c^* = \sum p_i c_i = c_{\Sigma} \sum p_i R_i. \quad (3.8)$$

Теперь можно вычислить абсолютную (Δc) и относительную (δc) погрешности оценок суммарного содержания однотипных аналитов:

$$\Delta c = c^* - c_{\Sigma} = c_{\Sigma} (\sum p_i R_i - 1), \quad (3.9)$$

$$\delta c = \sum p_i R_i - 1. \quad (3.10)$$

Выведенная формула (3.10) очень важна. Она применима для априорной оценки систематической погрешности, возникающей из-за неодинаковой чувствительности определения аналитов данной группы. Формула (3.10) выполняется независимо от того, имеется ли $X_{\text{ст}}$ в составе данной пробы или нет. Это важное преимущество, поскольку при определении суммарного содержания в пересчете на некоторое стандартное вещество аналитик зачастую не знает, присутствует ли оно в пробе. Естественно, по формуле (3.10) можно получать правильные прогнозы только в том случае, если другие составляющие систематической погрешности (например, вызванные неаддитивностью сигналов), а также случайные погрешности – пренебрежимо малы. Из формулы (3.10) следует:

1. Если все $p_i = 1$, т. е. коэффициенты чувствительности всех аналитов равны $K_{\text{ст}}$, оценка суммарного содержания будет правильной, независимо от соотношения концентраций аналитов. Оценка может оказаться правильной и при $p_i \neq 1$, если концентрации компонентов случайно окажутся такими, что $\sum p_i R_i = 1$. При $\sum p_i R_i > 1$ оценка c_{Σ} будет завышенной, а при $\sum p_i R_i < 1$ – заниженной.

2. Величина δc не должна зависеть от c_{Σ} (при использовании одного и того же $X_{\text{ст}}$). Переход от одной пробы к другой с приблизительно тем же набором и соотношением аналитов, но другой их суммарной концентрацией, не должен влиять на δc . Это означает, что систематическая погрешность, возникающая из-за внутригрупповой селективности должна иметь *мультипликативный* характер, что в дальнейшем было подтверждено опытным путем.

3. Оценка c_{Σ} будет правильной ($\delta c = 0$) при $\sum p_i R_i = 1$. Это позволяет выбрать оптимальное значение $K_{\text{ст}}$:

$$(K_{\text{ст}})_{\text{опт}} = \sum K_i R_i. \quad (3.11)$$

Если концентрации аналитов примерно одинаковы, используем вещество, для которого

$$K_{\text{ст}} = \frac{\sum K_i}{n} = \overline{K_i}. \quad (3.12)$$

При других соотношениях концентраций оптимальное значение $K_{\text{ст}}$ будет отличаться от $\overline{K_i}$, но оно должно принадлежать интервалу (K_1, K_n) . Если не удастся найти подходящее индивидуальное вещество, в качестве $X_{\text{ст}}$ можно использовать стандартную смесь 2–3 разных веществ, взятых в таком соотношении, чтобы получить желаемое значение $K_{\text{ст}}$. Примерами могут быть смесь Симарда или смесь ГОИН, используемые при определении суммарного содержания нефтепродуктов.

Пример 3.1. В табл. 3.5 приведены концентрации компонентов гипотетической смеси (c_i) и коэффициенты чувствительности при определении этих компонентов по заданной методике (K_i). Указаны также нормированные (безразмерные) значения этих величин, вычисленные по формулам (3.6) и (3.7). Нормированные значения K_i вычислены с учетом чувствительности определения стандарта ($K_{\text{ст}} = 150$).

Таблица 3.5

**Состав гипотетической смеси
и чувствительность определения ее компонентов**

X_i	c_i	K_i	p_i	R_i	$p_i R_i$
X_1	0,0010	100	0,67	0,100	0,067
X_2	0,0020	120	0,80	0,200	0,160
X_3	0,0040	150	1,00	0,400	0,400
X_4	0,0020	220	1,47	0,200	0,294
X_5	0,0010	250	1,67	0,100	0,167

Решение. Подстановка значений p_i и R_i в (3.10) приводит к $\sum p_i R_i = 1,088$ и $\delta c = 0,088$. Найденное по градуировочному графику значение интегрального показателя будет на 8,8 % выше, чем действительное значение c_{Σ} . Расчеты по формуле (3.10) показывают, что погрешность δc должна закономерно меняться при использовании других стандартов (с другими $K_{\text{ст}}$) (табл. 3.6).

В этой и последующих таблицах относительная погрешность выражена в процентах.

Таблица 3.6

Прогнозируемые погрешности при определении суммарного содержания компонентов гипотетической пятикомпонентной смеси в пересчете на разные стандарты

K_{cm}	$\sum p_i R_i$	$\delta c, \%$
50	3,26	226
100	1,63	63
120	1,36	36
150	1,088	9
165	0,988	-1
200	0,815	-18
250	0,652	-35
400	0,408	-59

При увеличении $K_{ст}$ величина $\sum p_i R_i$ монотонно снижается (обратно пропорционально росту $K_{ст}$), а относительная погрешность δc , взятая по модулю, проходит через минимум. В качестве внешнего стандарта (как и в качестве внутреннего) надо использовать соединения, отвечающие условию $K_1 < K_{ст} < K_n$. Это приблизит $\sum p_i R_i$ к 1 и позволит снизить (по модулю) погрешность оценки, хотя и не устранит ее полностью. Однако выполнение условия $\sum p_i R_i = 1$ зависит не только от коэффициентов чувствительности, но и от значений R_i , т. е. от состава пробы.

3.2.2. Экспериментальная проверка предложенного алгоритма

Разработанный алгоритм проверяли, используя модельные смеси известного состава, содержащие АО фенольного типа, а именно кверцетин, галловую кислоту, аскорбиновую кислоту, протокатеховую кислоту, рутин, катехол (пирокатехин), феруловую кислоту. Аналитические сигналы антиоксидантов получали

в видимой области по методу FRAP, т. е. во всех случаях вводили избыток фотометрического реагента, содержащего ионы Fe(III) и 1,10-фенантролин (или 2,2'-дипиридил). Все антиоксиданты фенольного типа (АО) являются восстановителями и превращают реагент в окрашенный продукт – фенантролиновый (или дипиридиновый) комплекс железа(II). Оптическую плотность слабых водных растворов измеряли спустя 10 или 60 мин («время экспозиции») после начала реакции, относительно чистого растворителя, при 510 нм, а в случае дипиридила – при 520 нм. Использовали спектрофотометры Agilent 8453 и КФК-3-01. Все опыты повторяли 3–4 раза, а результаты обрабатывали статистическими методами, предполагающими нормальное распределение случайных погрешностей. Для всех перечисленных антиоксидантов были получены прямолинейные градуировочные графики, проходящие через начало координат, но имеющие различный наклон (причины различий обсуждались в разделе 3.1). Примером может быть веер градуировок (рис. 3.1), полученный при времени экспозиции 60 мин. Аналогичные «вееры градуировок» были получены для других условий формирования и измерения аналитических сигналов. В табл. 3.7 приведены найденные по методу наименьших квадратов коэффициенты чувствительности тех же АО, нормированные по одному и тому же стандартному веществу – аскорбиновой кислоте. Во всех случаях $K_{\text{ст}}$ измеряли в тех же условиях, что и K_i .

Из табл. 3.7 видно, что на относительную чувствительность определения индивидуальных АО влияют не только природа АО (основной фактор), но и выбор индикаторной системы, а также время экспозиции. Во всех случаях оптические плотности фотометрируемых растворов в довольно широком интервале концентраций подчиняются закону Бугера–Ламберта–Бера, коэффициенты линейной корреляции превышают 0,99.

Таблица 3.7

Нормированные по аскорбиновой кислоте коэффициенты чувствительности (p_i) при спектрофотометрическом определении антиоксидантов для разных времен экспозиции и разных индикаторных систем

АО	<i>Fe(III) – 2,2'-дипиридил</i>		<i>Fe(III) – фенантролин</i>	
	<i>10 мин</i>	<i>60 мин</i>	<i>10 мин</i>	<i>60 мин</i>
КВ	2,09	2,42	2,02	3,28
ГК	1,74	1,61	2,43	3,02
АК	1,00	1,00	1,00	1,00
ПКК	0,83	1,03	0,95	1,58
РТ	0,69	1,03	0,88	1,35
КТ	0,86	0,73	1,02	1,12
ФК	0,71	0,57	1,02	1,00

На следующем этапе проверки были приготовлены модельные смеси АО, содержавшие от 2 до 5 индивидуальных АО. Концентрации компонентов в фотометрируемых растворах были величинами одного порядка и не выходили за пределы линейного участка соответствующих градуировочных графиков. Суммарная концентрация всех АО в любой смеси не превышала 5 мкМ, поскольку в более концентрированных растворах иногда возникала неаддитивность результирующего сигнала. Проверку аддитивности светопоглощения исследуемых смесей проводили по статистическим критериям [129; 130]. Смеси, для которых отклонения от аддитивности оказались статистически значимы, в дальнейших исследованиях не использовали.

В табл. 3.8 приведены составы модельных смесей АО и найденные по методу FRAP значения их интегральной антиоксидантной активности (c^*), в пересчете на аскорбиновую кислоту. Использована индикаторная система Fe(III) – 2,2'-дипиридил. Реальные погрешности анализа ($\delta c_{\text{экс}}$) довольно хорошо совпадают с прогнозами ($\delta c_{\text{теор}}$). Небольшие расхождения связаны с влиянием случайных погрешностей измерения оптических плотностей

и объемов, а также с погрешностями округления промежуточных данных. Совпадение прогнозов с экспериментом наблюдалось и для другой индикаторной системы, и для других экспозиций.

Таблица 3.8

**Ожидаемые и реальные погрешности
при оценке суммарного содержания АО**

№ смеси	АО	c_i , мкМ	R_i	p_i	$p_i R_i$	$\Sigma p_i R_i$	c^* , мкМ	Σc , мкМ	$\delta c_{теор}$, %	$\delta c_{эксп}$, %
1	АК	3,0	0,73	1,00	0,73	1,38	5,9	4,1	+38	+44
	КВ	1,1	0,27	2,42	0,65					
2	КВ	1,1	0,27	2,42	0,65	1,40	6,2	4,1	+40	+51
	РТ	3,0	0,73	1,03	0,75					
3	АК	0,7	0,19	1,00	0,19	1,02	4,1	3,7	+2	+11
	РТ	3,0	0,81	1,03	0,83					
6	КВ	0,5	0,12	2,42	0,29	0,79	3,3	4,0	-21	-18
	ФК	3,5	0,88	0,57	0,50					
8	АК	1,9	0,48	1,00	0,48	1,22	4,7	4,0	+22	+18
	КВ	0,6	0,15	2,42	0,36					
	РТ	1,5	0,37	1,03	0,38					
10	АК	1,5	0,37	1,00	0,37	0,91	3,7	4,0	-9	-7,5
	КТ	1,5	0,38	0,75	0,28					
	ПКК	1,0	0,25	1,02	0,26					

Применение в качестве внешних стандартов кверцетина или галловой кислоты, имеющих большие коэффициенты чувствительности, чем другие АО, должно было приводить и на самом деле приводило к заниженным оценкам суммарного содержания антиоксидантов. Наоборот, применение в качестве стандарта феруловой кислоты или железа(II), определяемых с малой чувствительностью, должно было приводить к завышенным оценкам. Примером могут быть данные по трехкомпонентной смеси АК + КТ + ПКК (табл. 3.9).

Таблица 3.9

**Ожидаемые и реальные погрешности ($\delta c, \%$)
при оценке суммарного содержания АО в смеси АК + КТ + ПКК
при использовании разных стандартов**

Стандарт	<i>Fe(III) – 2,2'-дипиридил</i>		<i>Fe(III) – фенантролин</i>	
	<i>прогноз по (3.10)</i>	<i>эксперимент</i>	<i>прогноз по (3.10)</i>	<i>эксперимент</i>
КВ**	–62	–62	–64	–69
ГК**	–43	–43	–61	–67
ПКК*	–11	–10	–25	–36
РТ**	–12	–10	–12	–25
АК*	–9	–8	+20	+6
ФК**	+59	+61	+20	+12

Примечание. Состав смеси (мкМ): АК – 1,5; КТ – 1,5; ПКК – 1,0.

$c_{\text{Fe(III)}} = 120$ мкМ, $c_{\text{dipy}} = c_{\text{Phen}} = 240$ мкМ, 60 мин.

* Метод внутреннего стандарта.

** Метод внешнего стандарта.

Судя по данным, представленным в табл. 3.9, лучшие оценки суммарного содержания АО можно получить, используя в качестве $X_{\text{ст}}$ аскорбиновую кислоту. Видно также, что правильность прогнозов не зависит от того, входит ли $X_{\text{ст}}$ в состав анализируемой смеси или является внешним стандартом.

Решая вопрос о возможности практического использования изложенного алгоритма, следует отдельно рассматривать два случая:

1. *Анализ объектов с приблизительно неизменным набором и стабильным соотношением концентраций аналитов* (смеси первого типа). Примером может быть мониторинг суммарного содержания фенолов в очищенных сточных водах некоторого предприятия или мониторинг суммарного содержания антиоксидантов в многокомпонентной биологически активной добавке, имеющей заданную рецептуру (номинальный состав) и серийно выпускаемой на некотором предприятии. Для смесей первого типа $\sum p_i R_i$ – константа, поэтому систематическая погрешность определения суммарного содержания аналитов, вызываемая отличиями K_i от

$K_{\text{ст}}$, является мультипликативной. Эту погрешность можно уменьшить или даже исключить, используя заранее найденный поправочный коэффициент k , зависящий от выбора $X_{\text{ст}}$ и не меняющийся при изменении суммарного содержания аналитов. «Исправленный» результат $c^{**} = k c^*$ должен быть более точной оценкой суммарного содержания аналитов, чем c^* . Как следует из формулы (3.8), поправочный коэффициент k можно вычислить заранее, если известны коэффициенты чувствительности и относительные содержания аналитов, а именно:

$$k = (\sum p_i R_i)^{-1}, \quad (3.13)$$

$$c_{\Sigma} \approx c^{**} = c^* / \sum p_i R_i. \quad (3.14)$$

Введение заранее рассчитанного поправочного коэффициента $k = (\sum p_i R_i)^{-1}$ должно приводить к оценкам суммарного содержания аналитов, теоретически независимым от выбора $X_{\text{ст}}$, что и было подтверждено в наших опытах со смесями антиоксидантов (табл. 3.10).

Таблица 3.10

**Результаты анализа смеси АК + КВ + РТ ($c_{\Sigma} = 4,0$ мкМ)
до и после введения поправки на чувствительность
определения аналитов**

Стандарт	k	Оценка, мкМ		Погрешность, %	
		c^*	c^{**}	$\delta c_{\text{эсп}}$	$\delta c_{\text{испр}}$
КВ	2,00	2,15	4,30	−46,3	7,5
ГК	1,66	2,60	4,31	−35,0	7,8
АК	0,956	4,51	4,31	12,8	7,8
ПКК	0,793	5,43	4,31	35,8	7,7
ФК	0,679	6,34	4,30	58,5	7,7
РТ	0,656	6,57	4,31	64,3	7,7

Примечание. Состав смеси (мкМ): АК – 1,9; КТ – 0,6; ПКК – 1,5.

Система Fe(III) – 2,2'-дипиридил; $c_{\text{Fe(III)}} = 120$ мкМ,

$c_{\text{dipy}} = 240$ мкМ, экспозиция – 10 мин.

Очевидно, прогнозировать δc по формулам (3.10) или (3.12), а также оптимизировать выбор $X_{ст}$ можно лишь в тех случаях, когда относительные концентрации аналитов (R_i) априорно известны. Такие ситуации в практике анализа встречаются (оценка солености морской воды и др.), хотя и редко.

2. *Анализ объектов с меняющимся от пробы к пробе набором аналитов и/или непредсказуемым соотношением концентраций разных аналитов* (смеси второго типа). С такими смесями обычно работают лаборатории, контролирующие состав объектов окружающей среды. Для смесей второго типа систематическая погрешность оценки суммарных содержаний с помощью интегральных показателей должна меняться от пробы к пробе. Прогнозировать ее по формуле (3.10) или вносить поправки по формуле (3.14) нельзя, поскольку для смесей второго типа значения R_i неизвестны и непостоянны.

3.3. Смеси неизвестного состава: прогнозирование предельной погрешности

К сожалению, использовать описанный в разделе 3.2 алгоритм, а также оптимизировать выбор $X_{ст}$ нельзя при неизвестном соотношении концентраций аналитов, присутствующих в пробе в виде смеси, а тем более – при неизвестном качественном составе смеси. Такие ситуации особенно характерны для анализа объектов окружающей среды. Выходом может быть прогнозирование предельных значений δc (далее δc_{max}) для анализа смесей данного типа, без учета их индивидуального состава, но с учетом выбранного способа измерения c^* . Этот подход не является чем-то абсолютно новым. Нормативные документы, регламентирующие оценку суммарного содержания однотипных веществ, нередко требуют контролировать величину δc_{max} . Так, погрешность определения суммарного содержания нефтепродуктов в водах не должна по модулю превышать 40 % (норматив зависит от содержания нефтепродуктов) [62]. Способы прогнозирования предельных погрешностей в литературе не описаны.

Возможны разные подходы к прогнозированию δc_{\max} – с учетом свойств $X_{\text{ст}}$ или без их учета. Если $X_{\text{ст}}$ присутствует в пробах, можно также учесть ожидаемое содержание этого вещества. Далее будут изложены алгоритмы расчета δc_{\max} для каждого из этих случаев.

3.3.1. Прогнозирование δc_{\max} без учета свойств $X_{\text{ст}}$

Сохраняем систему обозначений, использованную в разделе 3.2. Рассмотрим совокупность *всех смесей*, содержащих любые аналиты данного типа ($X_1, X_2, X_3, \dots, X_m$). Качественный состав единичных проб, а также относительные концентрации и коэффициенты чувствительности присутствующих в них аналитов считаем неизвестными. Известен лишь интервал (K_1, K_m) , в котором находятся коэффициенты чувствительности всех аналитов данного типа (в том числе отсутствующих в той или иной пробе) в условиях измерения A_{Σ} . Общее число аналитов m не может быть меньше числа аналитов, присутствующих в единичной пробе, т. е. $m \geq n$. Тому же интервалу (K_1, K_m) принадлежат коэффициенты чувствительности предполагаемых стандартных веществ. Считаем, что в анализируемых пробах этих веществ нет. Символом T обозначим отношение максимального и минимального коэффициентов чувствительности при определении аналитов данного типа по данной методике:

$$T = K_m / K_1.$$

Соотношения максимального и минимального коэффициентов чувствительности для аналитов, входящих в отдельные пробы, не превышают T . Чем шире веер градуировок, характеризуемый параметром T , тем большими по модулю могут быть погрешности при оценке суммарного содержания аналитов в отдельных пробах. Найдем пределы, в которых может оказаться δc при произвольном соотношении аналитов и любом значении $X_{\text{ст}}$. Погрешность δc выражаем в долях единицы. Она будет иметь наибольшую *положительную* величину ($\delta c_{\max+}$), если все присутствующие аналиты определяются с максимально возможной, а $X_{\text{ст}}$ – с минимально

возможной чувствительностью. Тогда $K_{\text{ст}} = K_1$, все $K_i = K_m = TK_1$, а $p_i = T$. Поскольку $\sum R_i = 1$, из (3.10) следует:

$$\delta c_{\text{max}+} = \sum p_i R_i - 1 = (T \sum R_i) - 1 = T - 1. \quad (3.15)$$

Наоборот, δc примет максимальное по модулю *отрицательное* значение $\delta c_{\text{max}-}$, если все аналиты пробы будут определяться с чувствительностью, минимальной для аналитов данного типа, а стандартное вещество – с максимальной чувствительностью. Тогда все $K_i = K_1$, $K_{\text{ст}} = K_m = TK_1$, а все p_i равны $1/T$. Из (3.10) следует:

$$\delta c_{\text{max}-} = \sum p_i R_i - 1 = \sum T^{-1} R_i - 1 = (T^{-1} \sum R_i) - 1 = T^{-1} - 1. \quad (3.16)$$

При любом $X_{\text{ст}}$ относительные погрешности анализа входят в интервал

$$T^{-1} - 1 \leq \delta c \leq T - 1. \quad (3.17)$$

При $T > 1$ справедливо неравенство $|\delta c_{\text{max}-}| < |\delta c_{\text{max}+}|$. Упрощенно можно считать, что искомая предельная погрешность анализа смесей данного типа по данной методике равна

$$|\delta c_{\text{max}}| \approx T - 1. \quad (3.18)$$

Правильнее было бы раздельно вычислять пределы положительных и отрицательных погрешностей (сплошные кривые 1 и 4 на рис. 3.4). Однако это уточнение малосущественно.

Из (3.18) видно, что чем больше T , тем шире интервал возможных погрешностей. При $T = 1,5$ значения δc могут по модулю доходить до 50 отн. %, при $T = 2$ – до 100 отн. %. Можно рассчитать и минимальное значение параметра T , которое, независимо от выбора $X_{\text{ст}}$, обеспечит необходимый минимум δc_{max} (обратная задача). Так, независимо от выбора стандартного вещества предельно допустимый 40%-й уровень предельной погрешности при определении нефтепродуктов в среднезагрязненных водах [62] будет обеспечен, если параметр T не превышает 1,4. Для точной оценки суммарного содержания аналитов надо менять условия измерений или способ расчета c^* так, чтобы нивелировать чувствительность определения аналитов ($T \rightarrow 1$).

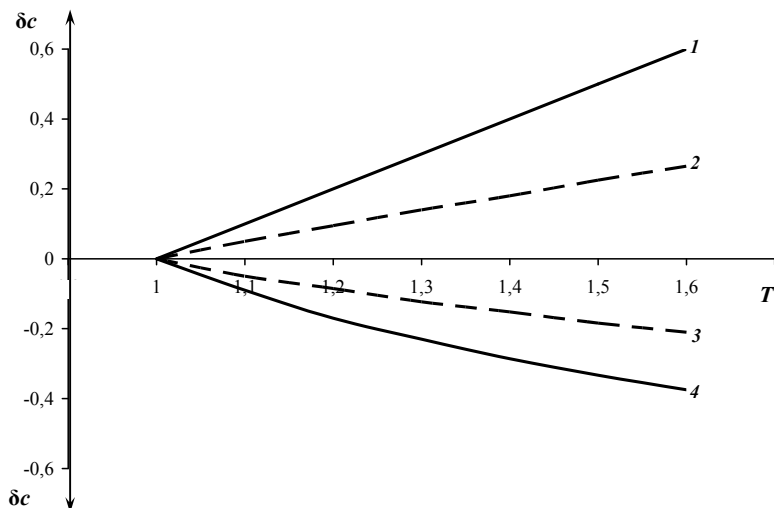


Рис. 3.4. Границы интервала погрешностей, характеризующего оценки c_x при разных T :

1, 2 – максимальные значения положительной погрешности;
 3, 4 – максимальные (по модулю) значения отрицательной погрешности.
 Кривые 1 и 4 рассчитаны по формулам (3.15) и (3.16) без учета K_{cm} ;
 кривые 2, 3 – по формулам (3.19) и (3.20) для $K_{cm} = (K_1 K_m)^{0,5}$

Отметим, что выведенные формулы приводят к очень широким интервалам погрешностей, включающим значения δc , получаемые при самом неудачном выборе $X_{ст}$. На практике надо прогнозировать интервалы погрешностей с учетом природы, а в некоторых случаях и концентрации заранее выбранного стандартного вещества.

3.3.2. Прогнозирование δc_{max} с учетом свойств стандартного вещества

Будем считать, что вещество $X_{ст}$ заранее выбрано, значение $K_{ст}$ отвечает условию $K_1 \leq K_{ст} \leq K_m$, а в пробах $X_{ст}$ отсутствует ($R_{ст} = 0$). Рассмотрим самый неблагоприятный случай: все аналиты пробы определяются с чувствительностью, максимальной для

данной группы аналитов, т. е. $K_i = K_n = K_m$. Введем константу $W = K_m / K_{\text{ст}}$. Тогда $K_i = WK_{\text{ст}}$. Подстановка $p_i = W$ в (3.10) и преобразования, аналогичные (3.15), позволяют найти максимально возможный уровень положительных погрешностей:

$$\delta c_{\text{max}+} = W - 1. \quad (3.19)$$

Максимальный (по модулю) уровень отрицательной погрешности достигается, если все $K_i = K_1$. Введем константу $Q = K_{\text{ст}} / K_1$. Значения T , W и $Q \geq 1$, а $QW = T$ (рис. 3.5). После преобразований по типу (3.16) получаем

$$\delta c_{\text{max}-} = Q^{-1} - 1. \quad (3.20)$$

Таким образом, погрешности оценки суммарного содержания однотипных аналитов при известном $X_{\text{ст}}$ должны находиться в границах интервала:

$$Q^{-1} - 1 \leq \delta c \leq W - 1. \quad (3.21)$$

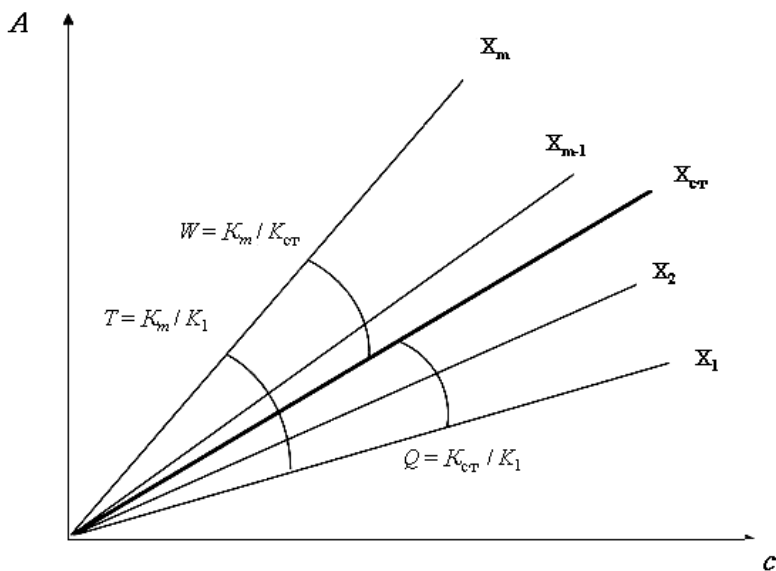


Рис. 3.5. Общий вид веера градуировок для группы однотипных аналитов

Поскольку константы Q и W определяются выбором $X_{\text{ст}}$, каждому $X_{\text{ст}}$ соответствует свой интервал возможных погрешностей. Так как константы W и Q меньше T , все интервалы типа (3.21) лежат внутри интервала (3.17) и являются более узкими, чем интервал (3.17). Это хорошо видно при рассмотрении рис. 3.4. Несложные алгебраические выкладки подтверждают, что выбор какого-либо $X_{\text{ст}}$ уменьшает ширину интервала (3.21) по сравнению с (3.17). В качестве стандарта следует выбирать вещество, определяемое с некоторой промежуточной (внутри данной группы аналитов) чувствительностью. Расчеты показывают, что при $K_{\text{ст}} = 0,5 (K_1 + K_m)$ пределы отрицательных и положительных погрешностей (значения $\delta c_{\text{max-}}$ и $\delta c_{\text{max+}}$) по модулю равны друг другу. Выбор такого стандарта обеспечивает меньшие значения $|\delta c_{\text{max}}|$, чем любой другой стандарт [114].

Правильный выбор стандартного вещества снижает предельную погрешность $|\delta c_{\text{max}}|$ до $(T-1)/(T+1)$. Примерно то же значение $|\delta c_{\text{max}}|$ будет получено и при $K_{\text{ст}} \approx (K_1 K_m)^{0,5}$, когда $W = Q$. Границы интервала, вычисленные для этого случая по формулам (3.19), (3.20), на рис. 3.4 показаны пунктирными линиями.

Пример 3.2. Аналиты некоторой группы в заданных условиях измерения их сигналов характеризуются коэффициентами чувствительности от $K_1 = 12$ до $K_m = 20$. Требуется оценить $|\delta c_{\text{max}}|$: а) при произвольном выборе $X_{\text{ст}}$ в пределах веера градуировок ($12 \leq K_{\text{ст}} \leq 20$); б) при $K_{\text{ст}} = (K_1 K_m)^{0,5} = 15,5$; в) при $K_{\text{ст}} = 0,5 (K_1 + K_m) = 16$.

Решение. $T = 20 / 12 = 1,67$. Для первого случая подходит формула (3.13):

$$1,67^{-1} - 1 \leq \delta c \leq 1,67 - 1, \text{ откуда } -0,40 \leq \delta c \leq 0,67.$$

Во втором случае $W = 20 / 15,5 = 1,29$, $Q = 15,5 / 12 = 1,29$. Применим формулу (3.17):

$$1,29^{-1} - 1 \leq \delta c \leq 1,29 - 1, \text{ откуда } -0,23 \leq \delta c \leq 0,29.$$

В третьем случае $W = 20 / 16 = 1,25$, $Q = 16 / 12 = 1,33$:

$$1,33^{-1} - 1 \leq \delta c \leq 1,25 - 1, \text{ откуда } -0,25 \leq \delta c \leq 0,25.$$

При самом неблагоприятном составе проб, содержащих аналиты данной группы, и самом неудачном выборе стандарта погрешности оценки суммарного содержания аналитов могут доходить до 67 %. Выбор в качестве $X_{\text{ст}}$ вещества, у которого $K_{\text{ст}} = 15,5$ (среднее геометрическое), снизит предельную погрешность до 29 %, а использование стандарта, у которого $K_{\text{ст}} = 16$ (среднее арифметическое), уменьшит ее до минимума (до 25 %).

Пример 3.2 показывает, что правильный выбор $X_{\text{ст}}$ позволяет в несколько раз снизить предельные значения погрешностей, но не может устранить эти погрешности полностью. Путем подбора $X_{\text{ст}}$ можно уменьшить δc до нуля только для единичной смеси известного состава [85], но не для всех смесей данного типа, различных по качественному составу и/или по соотношению концентраций аналитов.

3.3.3. Прогнозирование δc_{max} с учетом концентрации $X_{\text{ст}}$ в пробах

Несколько сложнее рассчитываются предельные погрешности, если вещество $X_{\text{ст}}$ присутствует в исследуемых пробах. В этом случае надо учитывать долю $X_{\text{ст}}$ в смеси аналитов ($R_{\text{ст}}$). Аналогичные вышеприведенным, но довольно громоздкие алгебраические выкладки приводят к формулам:

$$\delta c_{\text{max}+} = (W-1) (1 - R_{\text{ст}}); \quad (3.22)$$

$$\delta c_{\text{max}-} = (Q^{-1} - 1) (1 - R_{\text{ст}}); \quad (3.23)$$

$$(Q^{-1} - 1) (1 - R_{\text{ст}}) \leq \delta c \leq (W-1) (1 - R_{\text{ст}}). \quad (3.24)$$

При $R_{\text{ст}} \ll 1$, а также при неизвестной $R_{\text{ст}}$ вместо формулы (3.24) следует использовать формулу (3.21), хотя это приведет к несколько завышенным оценкам δc_{max} .

Сопоставление (3.24) и (3.21) показывает, что выбор в качестве $X_{\text{ст}}$ вещества, присутствующего во всех исследуемых пробах, приводит к дополнительному сужению интервала погрешностей по сравнению с (3.17). Выигрыш тем больше, чем выше $R_{\text{ст}}$. Последний вывод подтверждается практикой использования ИП:

аналитики часто выбирают в качестве $X_{\text{ст}}$ аналит, присутствующий во всех пробах данного типа и находящийся в избытке. Примером может быть оценка содержания летучих фенолов в пересчете на простейший фенол $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, который всегда присутствует и часто доминирует в техногенных смесях фенолов. Снижение погрешностей по мере роста $R_{\text{ст}}$ подтверждено и в опытах с модельными смесями [131]. Однако расчеты по формуле (3.24) затруднены – как правило, $R_{\text{ст}}$ неизвестна или меняется от пробы к пробе. Исключение – определение ИП методом добавок, но этот метод, редко применяемый при оценке суммарных содержаний, требует особого обсуждения.

Предельный уровень погрешностей иногда можно предсказать прямо по табличным характеристикам аналитов. В кондуктометрическом анализе для этого следует знать подвижности соответствующих ионов. Последующие расчеты показаны при решении примера 3.3.

Пример 3.3. Суммарное содержание солей в водных растворах выражают в моль-экв/л и оценивают кондуктометрическим методом. В качестве стандарта используют NaCl . Известно, что исследуемые пробы являются смесями хлоридов и нитратов калия, натрия и аммония. Соотношения концентраций разных солей неизвестны, мольная доля NaCl во всех смесях приблизительно равна 0,5. Требуется охарактеризовать систематическую погрешность метода (в %).

Решение. Используем данные о подвижности разных ионов в водных растворах [132], полагая, что коэффициенты чувствительности при кондуктометрическом определении солей пропорциональны суммам подвижностей соответствующих ионов (при прочих постоянных условиях). Попарно комбинируем подвижности ионов Na^+ , K^+ , NH_4^+ Cl^- и NO_3^- . Из всех возможно присутствующих солей с наибольшей чувствительностью определяется KCl ($\lambda_{\text{K}} + \lambda_{\text{Cl}} = 76 + 79 = 155$), с наименьшей – NaNO_3 ($\lambda_{\text{Na}} + \lambda_{\text{NO}_3} = 52 + 74 = 126$). Стандарт определяется с промежуточной чувствительностью ($\lambda_{\text{Na}} + \lambda_{\text{Cl}} = 52 + 79 = 131$). Отношения коэффициентов чувствительности равны: $T = 155 / 126 = 1,23$, что отвечает экспериментальным

данным; $W = 155 / 131 = 1,18$; $Q = 131 / 126 = 1,04$. Используем формулы (3.22) и (3.23):

$$\delta c_{\max+} = (W - 1) (1 - R_{\text{ст}}) = (1,18 - 1) (1 - 0,5) = 0,09;$$

$$\delta c_{\max-} = (Q^{-1} - 1) (1 - R_{\text{ст}}) = (1,04^{-1} - 1) (1 - 0,5) = -0,02.$$

Таким образом, суммарное содержание солей в пробах данного типа, выраженное в моль-экв/л, будет определяться с погрешностью, не превышающей 9 % (по модулю). Если бы требовалось оценить суммарное содержание солей в г/л или процентную концентрацию солевого раствора, коэффициенты чувствительности зависели бы не только от подвижности ионов, но и от молекулярной массы соли. Это могло привести и к росту, и к снижению δc_{\max} .

При действии факторов, не учитываемых нашей моделью, например при химическом взаимодействии разных аналитов или при плохой сходимости результатов измерений, реальные значения δc могут выйти за пределы, прогнозируемые по вышеприведенным формулам. Если же для измерения интегрального показателя будут выбраны условия, в которых некоторые аналиты данного типа вообще не определяются (например, не поглощают свет при выбранной аналитической длине волны), то прогнозировать δc_{\max} не удастся: для вычисления T и Q потребуются деление на 0. Продуманное формирование групп аналитов важно и при кондуктометрическом определении суммарного содержания солей. В группу совместно определяемых солей не следует включать слабодиссоциирующий хлорид ртути. Присутствие сильно гидролизующихся солей, определяемых (подобно кислотам и щелочам) с аномально высокой чувствительностью, также приведет к явно ошибочным оценкам c_{Σ} .

3.3.4. Экспериментальная проверка алгоритмов оценки предельной погрешности

Готовили модельные смеси трех типов: **А** – смеси бинарных солей, **Б** – смеси солей и сильных кислот; **В** – смеси фенолов. Смеси готовили из реагентов квалификации х.ч. или ч.д.а, а также из фиксаналов. Перечни аналитов каждого типа приведены

в табл. 3.11. Единичные смеси содержали по 2–4 аналита, причем соотношение их молярных концентраций не превышало 10:1. Всего было приготовлено около 100 смесей разного состава. Аналитические сигналы сильных электролитов (смеси **А** и **Б**) измеряли кондуктометрическим методом, используя кондуктометр АНИОН-4100 (Инфраспек-Аналит, Россия) с датчиком ДКВ. Вносили поправку на электропроводность растворителя. Удельную электропроводность χ растворов измеряли при 20–22 °С после установления стабильных показаний. Значения коэффициентов чувствительности приведены в табл. 3.11.

Таблица 3.11

Компоненты смесей типа А и Б и их коэффициенты чувствительности (K_i , $\text{См} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{л}$) при кондуктометрической оценке суммарных содержаний электролитов

<i>А (бинарные соли)</i>		<i>Б (соли и кислоты)</i>	
<i>Аналиты</i>	K_i	<i>Аналиты</i>	K_i
NaCl	93,0	NaCl	93,0
KCl	110,6	KCl	110,6
NaNO ₃	88,7	NaNO ₃	88,7
KNO ₃	105,7	BaCl ₂	173,8
NH ₄ NO ₃	107,2	HCl	360,3
NH ₄ Cl	110,8	HNO ₃	345,6
$T = 1,23$		$T = 4,06$	

Примечание. Выделены жирным шрифтом максимальные и минимальные коэффициенты чувствительности аналитов каждой группы, по которым вычисляли параметр T .

Смеси типа **В** анализировали спектрофотометрическим методом. Фенолы переводили в азокрасители по реакции Грисса, используя диазотированную сульфаниловую кислоту [24]. Во всех случаях $c_{\text{ДСК}} = 100$ мкМ, рН 8,3. Спектры поглощения окрашенных растворов снимали на спектрофотометре СФ-2000 и сопоставляли для выбора аналитических длин волн. Измеряли оптическую плотность окрашенных растворов при 410, 450 и 490 нм на

КФК-3-01 через 10 мин после добавления реагента; так же поступали в случае смесей фенолов. Сходимость измерений при повторном приготовлении окрашенных растворов характеризуется значениями s_r порядка 0,01. Для кондуктометрических измерений $s_r < 0,002$.

Аддитивность сигналов проверяли с учетом уровня случайных погрешностей, используя критерии, описанные в работах [129; 130]. Немногие смеси, для которых были выявлены статистически значимые ($\alpha = 0,05$) отклонения от аддитивности, в дальнейшем не использовали. Линейные градуировочные функции вида $y = a + Kc$ рассчитывали методом наименьших квадратов по 5–7 точкам, используя усредненные значения сигналов.

Значения интегральных показателей (c^*) рассчитывали по удельной электропроводности или по оптической плотности модельной смеси (многокомпонентного раствора), пользуясь предварительно полученными градуировочными графиками. Определив c^* и зная c_{Σ} , рассчитывали $\delta c_{\text{эксп}}$ – реальную погрешность оценки суммарного содержания. Выборки значений $\delta c_{\text{эксп}}$, полученных для однотипных смесей с применением разных $X_{\text{ст}}$, сопоставляли с предельными значениями погрешности (значениями $\delta c_{\text{max+}}$ и $\delta c_{\text{min-}}$), рассчитанными для смесей соответствующего типа по формулам (3.19), (3.20) без учета соотношения аналитов и содержания $X_{\text{ст}}$ в той или иной пробе. Градуировочные графики для всех изученных соединений оказались линейными ($r > 0,99$). Рассчитанные по наклону графиков коэффициенты чувствительности соединений одной и той же группы достоверно различались. Значения параметра T зависели от состава группы аналитов. Аномально высокая чувствительность кондуктометрического определения кислот по сравнению с солями приводит к намного большим значениям T для смесей Б, чем для смесей А, содержащих только соли. Кроме того, параметр T зависит от способа и условий измерения аналитического сигнала. Как видно из табл. 3.1, различия в чувствительности определения разных фенолов сильнее проявляются при 450 нм, чем при 410 нм. Это объясняется

особенностями спектров поглощения азокрасителей, образованных разными фенолами. Причиной может быть не только различие молярных коэффициентов поглощения (ϵ), но и разная скорость взаимодействия фенолов с реагентом во время экспозиции. Это объясняет меньшую чувствительность определения нафтола по сравнению с простейшим фенолом (при всех длинах волн), хотя из-за удлинения цепи сопряжения у производных нафтола значения ϵ выше [24]. Реальные погрешности определения суммарных содержаний аналитов ($\delta c_{\text{эксп}}$) для всех смесей оказались статистически значимы. Независимо от типа смеси, способа измерения сигнала и выбора $X_{\text{ст}}$, значения $\delta c_{\text{эксп}}$ отвечали теоретическим прогнозам. В табл. 3.12 приведены вычисленные интервалы возможных погрешностей.

Таблица 3.12

**Результаты расчета предельных погрешностей (% отн.)
при оценке суммарного содержания аналитов
в смесях разного типа [4]**

<i>Тип смеси</i>	<i>Без учета природы $X_{\text{ст}}$ (3.15), (3.16)</i>			<i>С учетом априорного выбора $X_{\text{ст}}$</i>				
	<i>T</i>	$\delta c_{\text{max-}}$	$\delta c_{\text{max+}}$	$X_{\text{ст}}$	<i>Q</i>	<i>W</i>	$\delta c_{\text{max-}}$	$\delta c_{\text{max+}}$
А	1,23	-19	23	NaCl	1,04	1,19	-4	+19
				KNO ₃	1,19	1,05	-16	+5
Б	4,06	-75	306	NaCl	1,05	3,87	-5	+287
				BaCl ₂	1,96	2,07	-51	+107
				HCl	4,06	1	-75	0
В	2,68 (410 нм)	-63	170	Ф	2,68	1	-63	0
				ОК	2,19	1,22	-54	+22
				Н	1	2,68	0	+168

Видно, что для смесей любого типа учет свойств $X_{\text{ст}}$ сужает интервал возможных погрешностей. Использование разных $X_{\text{ст}}$ ведет к разным интервалам, но все они находятся внутри интервала, рассчитанного для произвольного $X_{\text{ст}}$.

Экспериментально найденные значения $\delta c_{\text{эксп}}$ для смесей любого типа находятся в широких интервалах, вычисленных по формулам (3.15), (3.16). Почти все значения $\delta c_{\text{эксп}}$ попадали и в более узкие интервалы, вычисленные по формулам (3.19), (3.20) с учетом свойств выбранного $X_{\text{ст}}$. Примером могут быть данные по 20 смесям типа Б (табл. 3.13).

Таблица 3.13

Прогнозируемые интервалы и реальные выборки погрешностей при кондуктометрическом определении суммарного содержания электролитов в смесях типа Б

<i>Стандартное вещество</i>	<i>Прогнозируемые интервалы, %</i>	<i>Реальные выборки, %</i>
Без учета $X_{\text{ст}}$	от -75 до +306	от -60 до +226
NaCl	от -5 до +287	от +56 до +226
BaCl ₂	от -51 до +107	от -19 до +71
HCl	от -75 до 0	от -60 до -15

В ряде случаев расчетные интервалы погрешностей были существенно шире, чем реальные выборки значений $\delta c_{\text{эксп}}$. Это может быть связано не только со случайными погрешностями измерений, но и с присутствием $X_{\text{ст}}$ во многих пробах, что сужает реальные выборки, однако этот эффект не учитывают формулы (3.19) и (3.20). Применение более точных формул (3.23) и (3.24) приводит к еще лучшему совпадению (табл. 3.14).

Таблица 3.14

Прогнозируемые интервалы и реальные выборки погрешностей при спектрометрическом определении суммарного содержания фенолов в 20 смесях типа В

<i>Стандартное вещество</i>	<i>Прогнозируемые пределы, %</i>	<i>Реальные выборки, %</i>
Фенол	от -63 до 0	от -66 до -1
о-Крезол	от -54 до +22	от -58 до +16
Нафтол	от 0 до +168	от -9 до +154

В заключение следует отметить, что систематические погрешности оценки суммарных содержаний обычно не выходят за пределы теоретических прогнозов, созданных на основе представлений о внутригрупповой селективности сигналов как основной причине появления систематической погрешности. Непредсказуемый состав единичных проб при прогнозировании предельных погрешностей можно не учитывать. При правильном выборе $X_{ст}$ и прогнозируемая, и реальная точность оценки суммарного содержания аналитов повышаются в несколько раз. Разрабатывая методики анализа реальных объектов, основанные на измерении интегральных показателей, надо нивелировать чувствительность определения аналитов данной группы, а затем использовать в качестве $X_{ст}$ соединения данной группы, обычно присутствующие в анализируемых пробах и определяемые со средней чувствительностью. Способы нивелирования коэффициентов чувствительности и результаты практического применения разработанных алгоритмов в анализе реальных объектов будут изложены в главе 5.

Следует учесть, что все приведенные теоретические положения и разработанные алгоритмы прогнозирования погрешностей предполагают аддитивный характер аналитических сигналов однотипных веществ. В реальных условиях довольно часто наблюдаются отклонения от аддитивности сигналов, в частности статистически значимые отклонения от аддитивности светопоглощения смесей органических веществ. Поэтому, прежде чем переходить от теоретических прогнозов и общих рекомендаций к оптимизации и применению частных методик оценки суммарного содержания однотипных веществ, следует рассмотреть проблему неаддитивности аналитических сигналов, способов выявления и устранения отклонений от аддитивности. Эти вопросы будут рассмотрены в главе 4.

Глава 4

НЕАДДИТИВНОСТЬ АНАЛИТИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ КАК ИСТОЧНИК НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ ИНТЕГРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

4.1. Общая характеристика и причины неаддитивности светопоглощения

Важным, но почти не изученным источником систематических погрешностей при определении суммарного содержания однотипных веществ является неаддитивность аналитических сигналов. Она может проявляться при измерении сигналов любого типа, но чаще всего с этим явлением сталкиваются в спектрофотометрическом анализе. Отклонения от аддитивности (ОА) важны не только как источник погрешностей анализа, но и в другом аспекте: еще А.К. Бабко указывал, что измерение ОА является инструментом для изучения химических реакций, в частности – способом изучения состава и прочности образующихся в растворе соединений, особенно комплексов и ассоциатов [133].

Утверждение «светопоглощение аддитивно» означает, что оптическая плотность смеси (A_{Σ}) равна арифметической сумме оптических плотностей исходных компонентов (ΣA), измеренных по отдельности в тех же условиях, при той же длине волны и с помощью той же аппаратуры. Слагаемые, входящие в величину ΣA , можно вычислять на основе закона Бугера–Ламберта–Бера, либо измерять непосредственно. Отметим, что ОА могут наблюдаться как в системах, где закон Бугера–Ламберта–Бера выполняется, так и в тех, где этот закон не выполняется.

Статистически значимые ОА обычно следует считать *кажущимися*. Это означает, что принцип аддитивности в данной системе выполнялся бы, если вычислять A_{Σ} по действительному (а не по исходному) составу фотометрируемого раствора, с учетом взаимодействия X и Y. Проверая аддитивность светопоглощения, учитывают только исходные компоненты исследуемой смеси, а не продукты их взаимодействия. Дело в том, что такие продукты (например, молекулярные ассоциаты) нередко образуются с низким выходом, неустойчивы, а их спектры поглощения плохо изучены [134]. Не учитывается в ходе проверки аддитивности и снижение концентраций реагентов в ходе их взаимодействия.

Величина ОА при выбранной длине волны λ может быть охарактеризована в абсолютной форме, в единицах оптической плотности:

$$\Delta A = A_{\Sigma} - \Sigma A. \quad (4.1)$$

Отклонения от аддитивности могут быть выражены и в относительной форме (δA , %):

$$\delta A = 100 \Delta A / \Sigma A. \quad (4.2)$$

Если растворы исходных веществ подчиняются закону Бугера–Ламберта–Бера, величина кажущегося отклонения от аддитивности при $l = 1$ см и $\lambda = \text{const}$ равна:

$$\Delta A = A_{\Sigma} - \Sigma \varepsilon_i c_i, \quad (4.3)$$

где ε_i – молярный коэффициент светопоглощения, а c_i – начальная концентрация (моль/л) i -го компонента смеси или его деривата. Естественно, значения ΔA могут быть как положительными, так и отрицательными.

Случайные погрешности при приготовлении растворов и в ходе измерения светопоглощения нарушают равенство (4.1) даже в том случае, когда компоненты исследуемой смеси не взаимодействуют. Влияние случайных погрешностей уменьшается при усреднении данных по n повторно приготовленным смесям; после усреднения данных отклонения от аддитивности обычно оказываются пренебрежимо малыми. Однако для некоторых смесей на-

блюдаются *статистически значимые отклонения*, постоянные по знаку и хорошо воспроизводимые при повторении измерений. Такие ОА нельзя объяснить случайными погрешностями приготовления растворов и оптических измерений. Далее рассматриваются только значимые ОА, так как именно они приводят к систематическим погрешностям при определении суммарного содержания однотипных веществ.

Статистически значимые отклонения от аддитивности обычно объясняются химическими реакциями между компонентами смеси. Однако они могут наблюдаться и в тех случаях, когда компоненты смеси однотипны по своей структуре и химически инертны, например при определении суммы аренов по их поглощению в УФ-области спектра или при определении суммарного содержания алканов по их поглощению в ИК-области. Причиной ОА в таких случаях может быть слабое межмолекулярное взаимодействие растворенных аналитов, в частности мицеллообразование и другие супрамолекулярные эффекты [135]. Причиной ОА могут быть и систематические погрешности измерений, обусловленные особенностями используемого спектрометра, особенно при измерении очень низких или очень высоких значений оптической плотности [136].

Отклонения от аддитивности преимущественно изучались в водных растворах, при измерении оптической плотности в видимой и УФ-области спектра. Аддитивность аналитических сигналов в ИК-области систематически не изучали, и отклонения от аддитивности в этой области выявлены лишь в немногих случаях. Примером могут быть нефтепродукты, содержащие в качестве присадок разные дитиофосфаты или карбонильные соединения [137]. К сожалению, спектроскописты нередко судят о взаимодействии компонентов смеси не по уравнениям типа (4.1), а по наличию или отсутствию сдвига полос поглощения. Однако сдвиги ($\Delta \bar{\nu}$) спектральных пиков в спектре смеси относительно пиков в эталонных спектрах компонентов не доказывает факт взаимодействия. Такой сдвиг может объясняться тривиальной суперпо-

зицией спектральных кривых при их аддитивном сложении [138]. В таких случаях традиционные алгоритмы обработки спектральных данных должны приводить к правильным результатам количественного анализа.

При измерении светопоглощения в УФ-области значимые ОА наблюдаются довольно часто. Так, при исследовании многокомпонентных растворов лекарственных веществ статистически достоверные ОА были выявлены в трех системах из шести изученных. Отклонения были выявлены и при изучении многокомпонентных растворов витаминов [139]. Вероятность столкнуться с неаддитивностью тем выше, чем больше компонентов входит в состав смеси и чем выше их концентрации.

Систематические погрешности оценки c_{Σ} , вызванные эффектом неаддитивности, приблизительно пропорциональны значениям ОА при аналитической длине волны. Если ОА невелики, небольшими будут и вызванные ими систематические погрешности анализа. По нашим данным, при измерении светопоглощения смеси *однотипных* веществ выявленные ОА обычно невелики; по модулю они редко превышают 20 % отн. Примером могут быть смеси полифенолов, спектры поглощения которых изучали в УФ области [41]. Таким образом, неаддитивность поглощения смеси однотипных аналитов является менее важным источником погрешностей, чем рассмотренные в предыдущей главе различия в чувствительности определения аналитов.

Отметим, что при раздельном определении однотипных аналитов влияние отклонений от аддитивности может быть гораздо более сильным, чем при оценке их суммарного содержания. Степень опасности ОА зависит от выбранного способа расчета индивидуальных концентраций. При использовании метода Фирордта даже небольшие ОА приводят к весьма значительным систематическим погрешностям [140]. С другой стороны, расчет концентраций индивидуальных веществ с применением хемометрического алгоритма PLS (метод проекции на латентные структуры) дает весьма точные результаты даже при наличии больших ОА,

поскольку многомерная PLS-градуировка тоже строится по «неаддитивным» смесям [141], происходит компенсация погрешностей.

Вероятность появления отклонений от аддитивности резко возрастает, если проводится *derivатизация однотипных аналитов*. Если в ходе анализа мы целенаправленно превращаем аналиты в новые соединения (например, интенсивно окрашенные), возникают совершенно иные источники отклонений. Кроме непосредственного взаимодействия аналитов, при одновременном протекании множества фотометрических реакций могут наблюдаться каталитические и индукционные эффекты, образование тройных комплексов и т. п. Наиболее вероятной причиной появления ОА при проведении фотометрических реакций является конкуренция аналитов за реагент [130]. Результаты определения суммарного содержания аналитов в этом случае будут достоверно заниженными. Примером может быть определение суммы антиоксидантов фенольного типа по методу FRAP. В этом случае значения ОА в некоторых бинарных и тройных системах были хорошо воспроизводимы, отрицательны, а по модулю составляли 30–70 % (рис. 4.1).

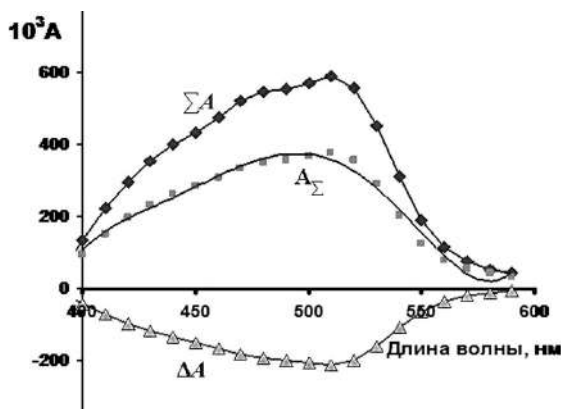


Рис. 4.1. Спектры поглощения продуктов взаимодействия аскорбиновой кислоты и кверцетина с реагентом (Fe(III) + о-фенантролин) при определении суммарного содержания антиоксидантов по методу FRAP [130]. $C_{AK} = 10 \cdot 10^{-6}$ М, $C_{KB} = 3 \cdot 10^{-6}$ М, $C_{Fe} = 6 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{phen} = 10 \cdot 10^{-5}$ М. pH 3,5, 25 °C, $\tau = 60$ мин

Установлено, что основной причиной возникновения ОА в этих системах является конкуренция компонентов (антиоксидантов) за реагент (ионы Fe^{3+}). Естественно, если заранее сильно увеличить концентрацию реагента, отклонения от аддитивности окажутся незначимыми, а результаты определения показателя АОА – достаточно точными [130; 142]. Очевидно, оценивая суммарные содержания однотипных веществ спектрометрическим методом и проводя для этого фотометрические реакции, **надо вводить реагент в большом избытке**. Это уменьшит опасность возникновения отклонений от аддитивности и повысит правильность результатов анализа.

Из всего изложенного следует вывод: **при разработке методик спектрофотометрического анализа неразделенных смесей необходимо проверять аддитивность сигналов**. Проверка нужна и в том случае, когда будет определяться суммарное содержание однотипных аналитов, и при раздельном определении их концентраций. Проверку надо делать даже в тех случаях, когда речь идет об определении инертных веществ по их собственному поглощению, без проведения фотометрических реакций, но она особенно важна, если методика включает такие реакции. Проверка требует прецизионных и многократно повторяемых измерений на приборах высокого класса, она ведется по определенному плану (см. 4.2). Результаты всех измерений должны быть статистически обработаны.

4.2. Выявление статистически значимых отклонений от аддитивности

Стандартных способов выявления статистически значимых ОА не существует. Чтобы отличить их от переменных по знаку и нестабильных по величине «отклонений», вызванных случайными погрешностями, нужно многократно приготовить и фотометрировать серию растворов, а затем провести статистическую обработку полученных данных, включая оценку значимости нуль-гипотезы. Известные способы статистической проверки аддитивности [137; 143; 144] слишком сложны и ограниченно применимы.

Нужны более информативные и, вместе с тем, достаточно простые способы, применимые для смесей любого состава, с любым числом компонентов. Такие способы должны быть применимы для обработки спектров любого типа, независимо от механизма возникновения ОА. Соответствующие способы были разработаны, проверены в экспериментах при измерении сигналов в разных областях спектра, а затем изложены в статьях [1; 130; 138; 142].

Проверять аддитивность светопоглощения смеси при $\lambda = \text{const}$ можно тремя принципиально разными способами: 1) при неизменном составе исследуемой смеси – это наиболее простой и наименее надежный способ; 2) при варьировании содержания одного из компонентов; 3) при одновременном варьировании содержаний двух и более компонентов. Заметим, что величина ОА зависит не только от природы проверяемой системы и длины волны, но и от соотношения концентраций компонентов смеси. Поэтому третий способ дает гораздо больше информации, чем второй и особенно первый, но он более трудоемок. Рассмотрим эти способы по очереди, как это сделано в работе [130].

4.2.1. Первый способ

Способ основан на применении стандартной процедуры сравнения средних значений двух выборок (по Стьюденту). Готовят растворы n компонентов исследуемой смеси, а именно: m одинаковых растворов вещества X_1 с концентрацией c_1 , m растворов X_2 с концентрацией c_2 , и так далее, вплоть до растворов X_n . Затем в одинаковых условиях измеряют светопоглощение всех растворов, получая матрицу результатов, содержащую m столбцов и n строк:

$$\begin{array}{ccccccc}
 A_{11} & A_{12} & \dots & A_{1j} & \dots & A_{1m} \\
 A_{21} & A_{22} & \dots & A_{2j} & \dots & A_{2m} \\
 \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\
 A_{n1} & A_{n2} & \dots & A_{nj} & \dots & A_{nm}
 \end{array} \quad (4.4)$$

Во всех случаях используют один и тот же растворитель, спектрофотометр, раствор сравнения. Грубые промахи должны быть исключены.

Строки характеризуют растворы одного вещества, столбцы – растворы разных веществ. Приготовление и фотометрирование каждого раствора рассматривают как единую операцию, независимую от приготовления и фотометрирования остальных растворов и отягощенную нормально распределенными случайными погрешностями. Суммируют результаты измерений по столбцам, получая первую выборку, содержащую m значений новой случайной величины $y_j = \Sigma A_{ij}$. Ее среднее значение – ΣA , а дисперсия – S_1^2 .

Затем готовят m одинаковых смесей, т. е. растворов, одновременно содержащих X_1 в концентрации c_1 , X_2 в концентрации c_2 , и т. д. Измеряют светопоглощение этих растворов, получая вторую выборку, включающую m вариантов:

$$A_{\Sigma 1}, A_{\Sigma 2}, \dots, A_{\Sigma q}, \dots, A_{\Sigma m}. \quad (4.5)$$

Ее среднее значение – A_{Σ} , а дисперсия – S_2^2 . Если отношение дисперсий S_1^2 и S_2^2 не превысит табличного значения критерия Фишера (Φ) для выбранного критического уровня значимости (например, для $\alpha = 0,01$), средние значения двух полученных выборок можно сопоставлять по Стьюденту. Нуль-гипотеза в этом случае – равенство математических ожиданий μ_1 и μ_2 , т. е. принадлежность обеих выборок одной и той же генеральной совокупности. Нуль-гипотеза опровергается на уровне значимости $\alpha = 0,01$, если:

$$t_{\text{эксп}} = |A_{\Sigma} - \Sigma A| / S_d > t_{0,01}. \quad (4.6)$$

Критерий $t_{0,01}$ берут для $(2m - 2)$ степеней свободы, а обобщенное по двум выборкам стандартное отклонение S_d рассчитывают по известной формуле:

$$S_d = \sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{m}}. \quad (4.7)$$

При неоднородности дисперсий S_1^2 и S_2^2 статистическое сравнение средних следует проводить несколько более сложным способом [145], однако неоднородность дисперсий при малых m представляется маловероятным событием.

Пример 4.1. Оптические плотности трех повторно приготовленных растворов толуола с одной и той же номинальной концентрацией оказались равными 0,27, 0,26 и 0,28; трех растворов нафталина – 0,40, 0,42 и 0,41; трех смесей, одновременно содержащих оба углеводороды в тех же концентрациях, – 0,74, 0,77 и 0,71. Во всех случаях растворитель – *n*-гептан, длина волны – 250 нм. Аддитивно ли светопоглощение смеси толуола и нафталина?

Решение. В первую выборку входят значения y_j , равные 0,67, 0,68 и 0,69, откуда $\Sigma A = 0,68$ при $S^2_1 = 1,0 \cdot 10^{-4}$. Во вторую входят значения $A_{\Sigma q} = 0,74, 0,77$ и $0,71$, откуда $A_{\Sigma} = 0,74$ при $S^2_2 = 9 \cdot 10^{-4}$. Дисперсии различаются в 9 раз, тогда как $\Phi_{0,01, 3, 3} = 99$. Таким образом, дисперсии считаем однородными. Из (4.7) следует, что $S_d = 0,0182$. Используем формулу (4.6):

$$t_{\text{экср}} = (0,74 - 0,68) / 0,0182 = 3,3, t_{0,01, 4} = 4,6.$$

Так как $t_{\text{экср}} < t_{0,01}$, различие A_{Σ} и ΣA не доказано, нуль-гипотеза сохраняется, светопоглощение смеси толуола и нафталина при 250 нм следует считать аддитивным.

Подстановка числовых значений t в (4.6) показывает, что при $S^2_1 \approx S^2_2$, $m = 3$ и $\alpha = 0,01$ критерием неаддитивности будет неравенство $|\Delta A| > 3,8 S_2$. При $\alpha = 0,05$ критерием окажется выражение $|\Delta A| > 2,3 S_2$. Эти числовые значения хорошо согласуются с предложенным И.В. Власовой и А.В. Шиловой эмпирическим критерием неаддитивности [129]:

$$|A_{\Sigma} - \Sigma A| > 3 S. \quad (4.8)$$

Величина S в формуле (4.8) учитывает разброс значений A_{Σ} при повторном приготовлении и фотометрировании смесей, но не учитывает погрешностей приготовления однокомпонентных растворов. Тем не менее применение «трехсигмового» критерия (4.8) обычно приводит к тем же результатам, что и применение теоретически обоснованного критерия (4.6). Естественно, чтобы судить о характере светопоглощения некоторой смеси, проверку по критериям (4.6) или (4.8) следует проводить несколько раз, используя данные для разных длин волн.

4.2.2. Второй способ

Этот способ основан на сопоставлении линейных регрессий, одна из которых аппроксимирует зависимость $A = f(c_{x1})$ в отсутствие посторонних веществ, а вторая – в присутствии других компонентов смеси. Допустим, что, кроме X_1 , в смеси присутствует X_2 . Чтобы сделать вывод о неаддитивном характере светопоглощения смесей, содержащих разные количества X_1 и одинаковые количества X_2 , надо доказать, что при введении X_2 зависимость $A = f(c_{x1})$ достоверно меняется, и это изменение не сводится к арифметическому суммированию сигналов X_1 и X_2 . Упрощенные варианты такой проверки использовали ранее другие авторы [93; 98; 146], но без статистических обоснований.

Допустим, в отсутствие посторонних веществ зависимость $A = f(c_{x1})$ адекватно описывается регрессией (4.9а), а в присутствии X_2 – регрессией (4.9б):

$$A = b_0 + b_1 c_{x1}, \quad (4.9a)$$

$$A = b_0^* + b_1^* c_{x1}. \quad (4.9б)$$

В присутствии X_2 (при $c_2 = \text{const}$) возможно либо изменение наклона градуировочного графика ($b_1 \neq b_1^*$), либо аномальный сдвиг графика по ординате ($b_0 + A_Y \neq b_0^*$), либо то и другое одновременно. Возможно также искривление графика (например, появление дополнительных слагаемых, включающих произведения концентраций). Однако искривление графика приведет и к изменению коэффициентов b_0 и b_1 , поэтому ограничимся рассмотрением этих коэффициентов. Устойчивый эффект взаимодействия компонентов надо отличить от небольших вариаций коэффициентов регрессии за счет случайных погрешностей при приготовлении и фотометрировании растворов. Примем в качестве нуль-гипотезы следующие выражения, включающие регрессионные коэффициенты:

$$b_0 + A_Y = b_0^*, \quad (4.10a)$$

$$b_1 = b_1^*. \quad (4.10б)$$

Корректный способ проверки нуль-гипотезы требует многократного построения градуировок на X_1 как в присутствии X_2 , так и без него, получения двух выборок для каждого из регрессионных коэффициентов и, наконец, сравнения средних значений соответствующих выборок по Стьюденту. Иногда сравнивают только значения b_1 и b_1^* [93].

Для проверки аддитивности можно обойтись и одной парой градуировок, поскольку компьютерные программы статистической обработки данных выдают МНК-оценки регрессионных коэффициентов в виде доверительных интервалов, рассчитанных для заданного уровня надежности P . Пересечение доверительных интервалов $(b_1 \pm \Delta b_1)$ и $(b_1^* \pm \Delta b_1^*)$ легко проверить, и это позволяет оценить значимость гипотезы (4.10б). А именно, светопоглощение смеси следует считать неаддитивным (на уровне значимости $\alpha = 1 - P$), если справедливо неравенство

$$|b_1^* - b_1| > (\Delta b_1 + \Delta b_1^*). \quad (4.11)$$

Проверить гипотезу (4.10а) несколько сложнее. Она должна отвергаться, если величина сдвига $|b_0^* - b_0|$ не будет принадлежать интервалу $A_{X_2} \pm (\Delta b_0 + \Delta b_0^*)$. Аномально большой сдвиг градуировки в присутствии X_2 ведет к неравенству (4.12а), аномально малый – к неравенству (4.12б):

$$|b_0^* - b_0| > A_{X_2} + (\Delta b_0 + \Delta b_0^*), \quad (4.12а)$$

$$|b_0^* - b_0| < A_{X_2} - (\Delta b_0 + \Delta b_0^*). \quad (4.12б)$$

Проверка аддитивности светопоглощения по изложенному алгоритму сводится к приготовлению двух серий модельных растворов: а) с разными концентрациями X_1 , взятыми в пределах зоны линейности градуировочного графика; б) с теми же концентрациями X_1 и фиксированной концентрацией X_2 . Отдельно несколько раз готовят раствор с той же концентрацией X_2 , не содержащий X_1 . При этом контролируют pH, температуру, ионную силу раствора. Все растворы фотометрируют в одинаковых условиях, рассчитывают уравнения градуировочных графиков и попарно сопоставляют регрессионные коэффициенты с учетом погрешностей их оценки.

Пример 4.2. Приготовлены и измерены в одинаковых условиях разные по концентрации растворы толуола, а также разные смеси толуола и нафталина. Во всех случаях растворитель – гептан, $\lambda = 250$ нм. Концентрация нафталина в смесях одинакова. Числовые данные приведены в таблице 4.1. Аддитивно ли светопоглощение смесей толуола и нафталина при 250 нм?

Решение. Обработка исходных данных с помощью любой программы для регрессионного анализа (например, Excel) позволяет получить значения регрессионных коэффициентов. Они приведены в последних столбцах таблицы исходных данных.

Таблица 4.1

**Исходные данные к примеру 4.2
и значения регрессионных коэффициентов**

Серия	Раствор	Концентрация, мкМ		A	Регрессионные коэффициенты	
		толуол	нафталин		b_0	b_1
1	1-1	–	–	0,000	$b_0 = 0,0066 \pm 0,0136$	$b_1 = (0,287 \pm 0,028) 10^{-3}$
	1-2	200	–	0,072		
	1-3	400	–	0,122		
	1-4	600	–	0,180		
	1-5	800	–	0,233		
2	2-1	–	100	0,235	$b_0^* = 0,244 \pm 0,021$	$b_1^* = (0,306 \pm 0,042) 10^{-3}$
	2-2	200	100	0,312		
	2-3	400	100	0,377		
	2-4	600	100	0,425		
	2-5	800	100	0,485		

Подставляем найденные коэффициенты в ранее выведенные формулы. Неравенство (4.11) не подтверждается:

$$|0,306 - 0,287| 10^{-3} < (0,042 + 0,028) 10^{-3}.$$

Не подтверждаются и неравенства (4.12а) и (4.12б). Вывод: нуль-гипотезу отбросить нельзя. Судя по полученным значениям регрессионных коэффициентов, при 250 нм светопоглощение растворов толуола, содержащих нафталин на уровне 100 мкмоль/л, можно считать аддитивным.

4.2.3. Третий способ

Данный способ предполагает одновременное варьирование концентраций двух и более компонентов смеси. Его можно реализовать в разных вариантах. Так, можно составить ряд модельных двухкомпонентных смесей, в котором содержание X_1 будет возрастать, а содержание X_2 – падать (по типу изомолярной серии). Затем можно будет оценить аддитивность поглощения каждой смеси первым способом и сопоставить значения δA при разных соотношениях концентраций [98; 146]. Однако более информативным вариантом представляется расчет статистической модели светопоглощения смеси. Модель должна включать не только концентрации исходных компонентов, но и их произведения. Соответствующие модели можно получить в ходе полного факторного эксперимента (ПФЭ) вида 2^n , где n – число компонентов смеси. Факторами должны быть концентрации компонентов, а параметром – светопоглощение (оптическая плотность) смеси на фиксированной длине волны. Состав каждой модельной смеси подбирали по стандартному алгоритму ПФЭ [147; 148]. Он включает: выбор центра плана (I_0) и интервалов варьирования (I) по каждому фактору, составление плана ПФЭ в общем виде и расчет концентраций компонентов на верхнем (+) и нижнем (–) уровнях. В ходе ПФЭ надо приготовить и измерить (профотометрировать) 2^n модельных смесей одинакового качественного, но разного количественного состава. Любую смесь готовят не менее 2 раз, фотометрируют в одинаковых условиях и проверяют однородность соответствующих дисперсий. После получения числовых данных рассчитывают регрессионные коэффициенты, отбраковывают незначимые коэффициенты на выбранном уровне значимости

нуль-гипотезы и записывают уравнение регрессии (в кодированных переменных) в следующем виде:

$$A^* = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ij} X_i X_j + \dots \quad (4.13)$$

Для получения модели удобно использовать стандартные программы обработки результатов ПФЭ, например программу PLAN [148]. Чтобы от кодированных (безразмерных) значений факторов (X) перейти к натуральным значениям (c , моль/л), используют соотношение

$$X_i = (c_i - c_{i0}) / I_i, \quad (4.14)$$

где c_i – значение i -го фактора в каком-либо опыте, c_{i0} – его значение в центре плана, I_i – его интервал варьирования.

Подставляя выражения типа (4.14) в уравнение (4.13), получают интерполяционную формулу, непосредственно включающую концентрации компонентов:

$$A^{**} = b_0 + \sum b_i c_i + \sum b_{ij} c_i c_j + \dots \quad (4.15)$$

Образование новых соединений и снижение концентраций исходных веществ должны приводить к изменению статистической модели, а именно – к изменениям регрессионных коэффициентов. Чтобы сделать вывод о неаддитивном характере светопоглощения, надо опровергнуть хотя бы одно из двух положений:

а) все регрессионные коэффициенты вида b_{ij} статистически незначимы, т. е. модель не включает произведений концентраций;

б) после перехода к натуральным переменным все регрессионные коэффициенты вида b_i совпадают (в пределах погрешности измерений) с коэффициентами чувствительности k_i , характерными для соответствующих X_i в отсутствие посторонних веществ. Значения k_i определяют по наклону градуировочных графиков.

В простейшем случае, когда поглощение смеси определяется самими аналитами, а не их дериватами (продуктами фотометрических реакций), следует проверить, совпадают ли регрессионные коэффициенты b_i с молярными коэффициентами поглощения аналитов (ε_i). Для повышения надежности лучше сравнивать

не единичные, а средние значения соответствующих выборок, проверяя по Стьюденту нуль-гипотезу о равенстве математических ожиданий выборок по b_i и ε_i . Совпадение k_i с ε_i при фиксированной λ , как и незначимость b_{ij} , позволяют сохранять нуль-гипотезу об аддитивности светопоглощения, но не могут служить доказательствами аддитивности, а тем более – доказательствами отсутствия взаимодействия компонентов.

Пример 4.3. Необходимо проверить адекватность светопоглощения тройной смеси ароматических углеводородов в следующей области концентраций: нафталин – до $2 \cdot 10^{-4}$ М, антрацен – до $2 \cdot 10^{-5}$ М, толуол – до $1,5 \cdot 10^{-3}$ М. Растворитель – *n*-гептан, $\lambda = 260$ нм.

Решение. Выбираем условия проведения ПФЭ, готовим 8 смесей с разными соотношениями компонентов, причем каждую смесь готовим и фотометрируем 3 раза. Результаты приведены в табл. 4.2. Компьютерная обработка полученных результатов приводит к выводу об однородности дисперсий и незначимости (при $\alpha = 0,01$) всех коэффициентов вида b_{ij} . Линейная регрессия (4.16) и полученная на ее основе интерполяционная формула (4.17) оказались адекватными. Невязки не превышают 2 %.

$$A^* = 0,3658 + 0,05083X_1 + 0,01750X_2 + 0,01167X_3, \quad (4.16)$$

$$A^{**} = 0,014 + 1271c_1 + 8750c_2 + 291,8c_3. \quad (4.17)$$

Таблица 4.2

Результаты ПФЭ для смесей ароматических углеводородов

№ опыта	Компоненты			$A_{\text{экс}} \text{ при } 260 \text{ нм}$				A^*	A^{**}
	X_1	X_2	X_3	1	2	3	сред.		
1	+	+	+	0,44	0,44	0,44	0,440	0,446	0,446
2	–	+	+	0,35	0,34	0,36	0,350	0,344	0,344
3	+	–	+	0,42	0,40	0,41	0,410	0,411	0,411
4	–	–	+	0,31	0,30	0,32	0,310	0,309	0,309
5	+	+	–	0,42	0,42	0,43	0,423	0,422	0,422
6	–	+	–	0,32	0,32	0,32	0,320	0,321	0,321
7	+	–	–	0,39	0,40	0,39	0,393	0,388	0,390
8	–	–	–	0,28	0,28	0,28	0,280	0,286	0,286

Примечание. A^* рассчитано по формуле (4.16), A^{**} – по формуле (4.17).

Модели (4.16) и (4.17) не содержат произведений факторов, а коэффициенты в формуле (4.17) практически совпадают с молярными коэффициентами поглощения соответствующих углеводородов при 260 нм. Таким образом, нуль-гипотеза не опровергается. Можно сделать вывод об аддитивном характере светопоглощения тройной смеси углеводородов при 260 нм в исследуемой области факторного пространства.

Изложенные способы проверки аддитивности не требуют регистрации спектров поглощения в широком интервале длин волн, они учитывают не только бинарные, но и более сложные взаимодействия компонентов. Однако при исследовании тройных и более сложных систем выявленный эффект неаддитивности трудно интерпретировать – не ясно, взаимодействие каких именно компонентов приводит к отклонениям от аддитивности.

Независимо от выбора того или иного способа проверки следует очень осторожно формулировать выводы, сделанные на основании полученных данных. Вывод «исследуемая система аддитивна, компоненты не взаимодействуют» некорректен, даже если проверка проводилась на нескольких длинах волн. Необнаружение статистически значимых ОА при выбранных длинах волн вовсе не означает отсутствия взаимодействия между компонентами. Возможно, такое взаимодействие имеется, но не сказывается на светопоглощении системы в данной области спектра и на данном концентрационном уровне. Переход к другим длинам волн или другим концентрациям может привести к выявлению неаддитивности. Напротив, вывод «система неаддитивна, компоненты взаимодействуют» можно сделать даже в том случае, когда проверка выявила значимые ОА лишь на одной длине волны и только при некотором соотношении компонентов. К сожалению, информации по влиянию состава смесей на аддитивность их светопоглощения очень мало.

Отклонения от аддитивности светопоглощения смесей органических соединений обычно считают непредсказуемыми. Это серьезно осложняет разработку соответствующих методик спек-

трофотометрического анализа. Проблема прогнозирования отклонений от аддитивности требует специального рассмотрения.

4.3. Прогнозирование отклонений от аддитивности с учетом состава смеси

Для прогнозирования ОА мы применили два дополняющих друга друга способа, а именно: 1) содержательное (априорное) моделирование; 2) статистическое (апостериорное) моделирование. Оговоримся, что оба способа не позволяют прогнозировать отклонения *ab initio* и применимы не во всех случаях. Необходимо заранее определить спектральные характеристики компонентов исследуемой смеси.

Первый способ предусматривает построение содержательной физико-химической модели; он применим лишь к тем системам, где известен (заранее установлен) химизм взаимодействия компонентов смеси, ведущий к неаддитивности светопоглощения. Второй способ предполагает построение статистической модели по результатам уже проведенного эксперимента. Второй вариант прогнозирования не требует предварительного изучения химизма взаимодействия компонентов исследуемой смеси, но он способен дать адекватные прогнозы лишь для некоторой ограниченной области факторного пространства, в которой ранее проводили эксперимент и для которой рассчитывали модель.

4.3.1. Использование содержательных моделей

Для произвольной системы, содержащей аналиты X и Y, кажущиеся отклонения от аддитивности могут в зависимости от длины волны оказаться положительными, нулевыми или отрицательными, даже если они вызываются одной и той же причиной. Это, на первый взгляд, парадоксальное утверждение не только соответствует экспериментальным данным, но и легко подтверждается с помощью простых математических выкладок [1]. Предположим, что в системе X–Y образуется ассоциат XY (1:1), причем образование XY идет со 100%-м выходом. Пусть для всех компо-

нентов выполняется закон Бугера–Ламберта–Бера, вещество Y взято в большом избытке, толщина кюветы равна 1 см, а раствором сравнения служит растворитель. Молярные коэффициенты поглощения для данной λ соответственно равны ε_X , ε_Y и ε_{XY} . Тогда для исходной смеси можно записать:

$$\Sigma A = A_X + A_Y = \varepsilon_X c_X + \varepsilon_Y c_Y. \quad (4.18)$$

После установления равновесия весь X и соответствующая часть Y превращаются в ассоциат, вклад Y в суммарную оптическую плотность снижается до A_Y^* . Тогда:

$$A_\Sigma = A_{XY} + A_Y^* = \varepsilon_{XY} c_X + \varepsilon_Y (c_Y - c_X) = (\varepsilon_{XY} - \varepsilon_Y) c_X + \varepsilon_Y c_Y. \quad (4.19)$$

Подставляя (4.18) и (4.19) в (4.1), получаем:

$$\Delta A = c_X (\varepsilon_{XY} - \varepsilon_X - \varepsilon_Y). \quad (4.20)$$

Из формулы (4.20) видно, что в тех спектральных интервалах, где молярный коэффициент поглощения ассоциата больше суммы молярных коэффициентов X и Y , ОА будут положительны, и наоборот. Таким образом, знак отклонения от аддитивности для одной и той же смеси может быть разным, он зависит от длины волны.

Из (4.20) следует, что при уменьшении c_X снижается и величина ΔA . Прямо пропорциональная зависимость ΔA от c_X указывает, что ΔA светопоглощения может быть аналитическим сигналом. Это согласуется с практикой спектрофотометрического анализа при использовании окрашенных фотометрических реагентов. При разбавлении растворов ОА могут стать статистически незначимыми. Но даже при высоких концентрациях X отклонения от аддитивности не будут наблюдаться в области длин волн, где $\varepsilon_{XY} \approx \varepsilon_X + \varepsilon_Y$. Поэтому необнаружение ОА при некоторой λ не доказывает, что система X – Y в целом аддитивна, а ее компоненты не реагируют друг с другом.

Переход к другой длине волны должен менять абсолютную величину ОА. Зависимость ΔA от λ (разностный спектр, спектр отклонений от аддитивности) по своему виду отличается от обыч-

ных спектров поглощения (рис. 4.1). Если спектры поглощения X, Y и XY известны, в рамках вышеприведенной модели можно прогнозировать зависимость ΔA от λ . И наоборот, получив эту зависимость опытным путем и убедившись в правильности выбранной модели, можно рассчитать спектр поглощения ассоциата, не выделяя его из смеси (препаративное выделение неустойчивых ассоциатов обычно невозможно).

Подставляя (4.20) в (4.2), получаем:

$$\delta A = \Delta A / \Sigma A = \frac{\varepsilon_{XY} - (\varepsilon_X + \varepsilon_Y)}{\varepsilon_X + \varepsilon_Y \frac{c_Y}{c_X}}. \quad (4.21)$$

Из уравнения (4.21) следует, что в случае образования ассоциата XY относительная величина ОА должна зависеть от соотношения начальных концентраций X и Y. А именно, увеличение концентрации Y при постоянной концентрации X должно приводить к снижению (по модулю) величины δA . Однако в нашей практике увеличение избытка макрокомпонента бинарной смеси по-разному сказывалось на величине δA . Наблюдалось как снижение, так и увеличение ОА, что можно объяснить разными механизмами формирования ОА, в том числе не связанными с образованием ассоциатов. Так, для системы «анальгин – кофеин» причиной неаддитивности оказалась побочная реакция окисления анальгина кислородом воздуха, скорость которой растет в присутствии кофеина.

4.3.2. Использование статистических моделей

Действительную связь ОА с составом смеси можно изучать, применяя статистические модели, создаваемые по результатам многофакторных экспериментов методами регрессионного анализа, как описано в подразделе 4.2.3. Адекватные полиномиальные модели можно использовать для прогнозирования ОА и вызванных ими погрешностей анализа [142]. Полученная модель покажет, какие именно компоненты смеси взаимодействуют.

Оптическую плотность смеси при заданной длине волны λ можно выразить через концентрации компонентов в виде регрессии:

$$A_{\Sigma} = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ij} X_i X_j, \quad (4.22)$$

где X – выраженные в кодированной форме начальные концентрации компонентов (аналитов); b_0, b_i, b_{ij} – регрессионные коэффициенты.

Регрессии типа (4.22) являются статистическими моделями светопоглощения смесей [134; 136]. Произведения трех и большего числа факторов при статистическом моделировании не учитывают, так как их вклад в светопоглощение смеси обычно близок к нулю. В регрессии типа (4.22) не включают и слагаемые, содержащие концентрации продуктов взаимодействия исходных компонентов, так как их состав и оптические свойства зачастую неизвестны. Мешают также неустойчивость и/или низкий выход таких продуктов. Образование новых соединений, а также снижение концентраций исходных веществ определяют модель косвенным образом – через регрессионные коэффициенты. Решение системы уравнений типа (4.22), полученных для разных λ , позволяет рассчитать концентрации компонентов [134]. Однако, по нашему мнению, статистические модели можно использовать не только для расчета концентраций, но и для решения других задач, а именно: а) для прогнозирования ΔA ; б) для выявления причин неаддитивности; в) для оптимизации методик анализа, в частности методик определения суммарного содержания однотипных веществ.

Для проверки этих утверждений был проведен объемный эксперимент [142], в ходе которого готовили смеси разного типа (А, В, С, D, E). Каждая смесь содержала от 2 до 5 однотипных органических соединений, а именно: ароматических углеводородов (А), кислот и оснований (В), лекарственных веществ (С), биоантиоксидантов фенольного типа (D), цис- и трансизомеров одного и того же органического соединения (E). Компоненты смесей типа А подбирали так, чтобы они не реагировали друг с другом, т. е. смеси типа А были заведомо аддитивными. Напротив, компонен-

ты смесей типа В должны были реагировать друг с другом даже в разбавленных растворах, эти смеси были заведомо неаддитивными. Характер светопоглощения остальных смесей заранее известен не был.

Модельные смеси одного и того же типа различались по содержанию компонентов. Соотношения концентраций компонентов подбирали так, чтобы вклады разных компонентов в суммарную оптическую плотность были величинами одного порядка; это повышает точность оценки регрессионных коэффициентов [147]. Соответственно, слабопоглощающие компоненты смесей вводили в избытке по сравнению с сильнопоглощающими. Максимально возможные концентрации компонентов (c_{\max} , М) рассчитывали с учетом их молярных коэффициентов поглощения. При $c < c_{\max}$ оптические плотности однокомпонентных растворов всех модельных соединений отвечали закону Бугера–Ламберта–Бера.

Для исследования систем, содержащих n компонентов, готовили 2^n модельных смесей с известными концентрациями компонентов, смешивая рабочие растворы в соответствии с планом ПФЭ. Состав смесей рассчитывали по стандартному алгоритму, включавшему выбор центра плана (I_0) и интервалов варьирования (I) по каждому фактору, составление плана в общем виде и расчет факторов (концентраций) на верхнем (+) и нижнем (–) уровнях. Для снижения влияния случайных погрешностей и проверки значимости регрессионных коэффициентов каждую смесь готовили не менее трех раз.

Компоненты смесей А, В и С поглощают в УФ-области, их аналитические сигналы получали без введения фотометрических реагентов. Аналитические сигналы антиоксидантов получали в видимой области, заранее вводя в смеси типа Д избыток реагента, содержащего ионы Fe(III) и 1,10-фенантролин. Все антиоксиданты фенольного типа (АО) являются восстановителями и превращают реагент в фенантролиновый комплекс железа(II).

Спектры поглощения смесей регистрировали на спектрофотометрах Agilent 8453, СФ-2000 или СФ-26 в кювете с толщиной

слоя 1,0 см относительно чистого растворителя. Оптическую плотность каждой смеси измеряли при 3–5 аналитических длинах волн (АДВ), причем измерения повторяли 2–3 раза, а результаты усредняли. Для расчета регрессионных коэффициентов применяли компьютерную программу PLAN [148]. Значимость коэффициентов регрессии и адекватность регрессий, полученных после отбраковки незначимых коэффициентов, проверяли при $P = 0,99$. Кодированные (безразмерные) значения факторов (X) и их натуральные значения (c , M) связаны соотношением

$$X_i = (c_i - c_{i0}) / I_i, \quad (4.23)$$

где c_i – значение i -го фактора в данном опыте; c_{i0} – его значение в центре плана; I_i – интервал варьирования этого фактора.

Подстановка (4.23) в уравнения регрессии ведет к интерполяционным формулам, непосредственно связывающим оптическую плотность смеси с концентрациями компонентов:

$$A_\Sigma = k_0 + \sum k_i c_i + \sum k_{ij} c_i c_j. \quad (4.24)$$

Для смесей всех типов были получены адекватные статистические модели. Как и следовало ожидать, для заведомо аддитивных смесей типа А коэффициенты при произведениях концентраций оказались статистически незначимыми, а для заведомо неаддитивных смесей типа В – значимыми. В частности, для смесей этилендиамина (X_1), бензойной кислоты (X_2) и аскорбиновой кислоты (X_3) при 255 нм получена следующая модель:

$$A = 0,1425 + 0,0233 X_1 + 0,0392 X_2 + 0,0096 X_3 + 0,0101 X_1 X_2.$$

Последнее слагаемое вносит значимый вклад в светопоглощение смеси, что указывает на взаимодействие этилендиамина и бензойной кислоты, ведущее к образованию продукта, поглощающего при данной длине волны. Еще более сложные модели потребовались для описания светопоглощения тех же смесей при 235 и 245 нм. В этих случаях значимым оказался и коэффициент b_{13} , что указывает на взаимодействие этилендиамина с аскорбиновой кислотой. Значения k_i и ε_i различались на порядок и более, а в некоторых случаях отличались даже по знаку. Сопоставление

спектров смесей и спектров компонентов, взятых порознь, подтвердило наличие отклонений от аддитивности. В зависимости от λ и состава смеси они составляли 20–60 % от ΣA .

Заметим, что характер светопоглощения смесей типа А и В правильно определяется как с помощью статистических моделей, так и известным (менее трудоемким) способом, основанным на вычислении ОА. Прогнозировать же величину ОА можно только с помощью статистических моделей. Для этого надо подставить в выражение (4.3) интерполяционную формулу (4.24). Получаем общее уравнение, по которому можно прогнозировать отклонения от аддитивности при любых начальных концентрациях компонентов:

$$\Delta A = k_0 + \sum (k_i - \varepsilon_i) c_i + \sum k_{ij} c_i c_j. \quad (4.25)$$

Для прогнозирования ΔA в каждом частном случае в (4.25) следует подставить заранее найденные числовые значения ε_i и k_i , а затем провести несложные преобразования. Так, для смеси этилендиамина, бензойной и аскорбиновой кислот при 255 нм получаем:

$$\Delta A = 0,018 - 0,33c_1 - 2766c_2 - 5221c_3 + 20833c_1 c_2. \quad (4.26)$$

Подобные модели позволяют выдвигать гипотезы о причинах неаддитивности. Например, модель (4.26) позволяет предположить, что наблюдаемые при 255 нм отклонения от аддитивности объясняются уменьшением концентраций обеих кислот, но этот эффект частично компенсируется образованием продукта реакции бензойной кислоты с этилендиамином (бензоат-ионов).

Предсказанные по модели (4.26) значения ΔA приблизительно совпадают с экспериментальными данными (табл. 4.3), причем не только при интерполяционных (верхняя строка), но и при экстраполяционных прогнозах (следующие строки). При удалении от центра плана ошибки экстраполяционных прогнозов возрастают. В тех случаях, когда состав смеси по одному или нескольким компонентам отличался от центра ПФЭ не более, чем на 4 интервала варьирования, ошибки прогноза не превышали 25 %.

Таблица 4.3

Прогнозирование отклонений для тройных смесей типа В при 255 нм

<i>c, M</i>			ΔA		
X_1	$X_2, 10^{-5}$	$X_3, 10^{-5}$	<i>прогноз</i>	<i>эксперимент</i>	<i>погрешность, %</i>
0,150	10	10	–0,520	–0,490	6,1
0,174	14	12	–0,483	–0,455	5,8
0,174	6	8	–0,408	–0,339	17
0,16	18	12	–0,500	–0,472	5,6
0,14	18	8	–0,425	–0,362	15
0,16	14	14	–0,530	–0,582	9,8
0,174	18	14	–0,610	–0,513	16
0,126	2	6	–0,322	–0,288	11
0,14	2	6	–0,315	–0,286	9,2
0,126	14	12	–0,748	–0,583	22
0,16	2	12	–0,650	–0,553	16

Примечание. Прогнозирование по формуле (4.26). Выделены жирным шрифтом концентрации компонентов, лежащие за пределами первоначального плана ПФЭ.

Ограничения изложенного алгоритма прогнозирования очевидны: 1) процессы, приводящие к неаддитивности, должны в исследуемых смесях идти так же, как в смесях, использованных для построения модели. То есть все смеси должны включать одни и те же компоненты, иметь те же значения pH, температуры и других переменных, что и в ходе ПФЭ (при построении модели); 2) состав любой смеси должен быть известен (или постулирован); 3) для всех компонентов должен выполняться закон Бугера–Ламберта–Бера.

4.4. Применение разработанных алгоритмов в анализе смесей разного типа

Вышеизложенные алгоритмы и модели были использованы для выявления, интерпретации, прогнозирования и уменьшения отклонений от аддитивности светопоглощения, возникающих в ходе анализа смесей лекарственных веществ (смеси типа С), смесей полифенольных антиоксидантов (смеси D), а также смесей цис- и трансизомеров. По смесям каждого типа была получена важная в химико-аналитическом отношении, ранее неизвестная информация, а именно:

1. *Смеси типа С* содержали соединения, входящие в состав препарата «Цитрамон» и некоторых других лекарственных препаратов. Это парацетамол (X_1), кофеин (X_2), ацетилсалициловая кислота (X_3) и лимонная кислота (X_4). В ходе ПФЭ было приготовлено 16 модельных смесей, не считая дублирующих опытов. Светопоглощение смесей измеряли в УФ-области при 240, 255, 270, 280 и 290 нм. Судя по полученным статистическим моделям, в области 255–290 нм светопоглощение аддитивно, а при $\lambda = 240$ нм – неаддитивно. Для $\lambda = 240$ нм получена адекватная нелинейная модель, включающая значимый коэффициент b_{14} . Очевидно, в исследуемых смесях кофеин взаимодействует с лимонной кислотой, что и приводит к положительным и статистически значимым отклонениям от аддитивности, проявляющимся при 240 нм. Этот факт был подтвержден другими методами. Прогнозирование отклонений от аддитивности приводило к приблизительному совпадению прогнозов с экспериментов (различия не превышали 20 % отн.). В практическом отношении важно, что в области 255–270 нм поглощение исследуемых смесей оказалось аддитивным (как в слабокислой, так и в щелочной средах). Именно эту область длин волн можно рекомендовать как для раздельного определения лекарственных веществ с применением хемометрических алгоритмов, так и для оценки их суммарного содержания в пересчете на какое-либо стандартное вещество.

2. Смеси типа D содержали антиоксиданты фенольного типа (кверцетин, рутин, галловая кислота, пирокатехин), а также их аналог – аскорбиновую кислоту. Статистические модели составляли для бинарных и тройных смесей. Аналитические сигналы измеряли в видимой области после проведения фотометрической реакции с железом(III) и орто-фенантролином. В некоторых системах были выявлены отрицательные отклонения от аддитивности, особенно явно выражены они в системе АК–КВ (рис. 4.1). Относительная величина отклонений (δA , %) в некоторых случаях доходила до 30–40 %. Результаты определения суммарного содержания АО при этом оказываются заниженными (табл. 4.4, верхние строки).

Таблица 4.4

Результаты определения суммарного содержания антиоксидантов в их модельных смесях (D) при разном избытке фотометрического реагента

Состав смеси, мкМ			Реагент, мл	Значимость ОА	Суммарное содержание АО, мкМ		δ , %	s_r
АК	КВ	РТ			введено*	найдено*		
10,0	3,0	–	1,0	+	25,8	16,4 ± 0,4	–36	0,02
10,0	1,0	–		+	18,9	16,6 ± 0,7	–12	0,03
2,5	1,2	4,0		+	12,7	12,1 ± 0,2	–5	0,02
10,0	1,0	–	3,0	–	14,0	13,5 ± 0,3	–3,5	0,01
2,5	1,2	4,0		–	14,7	14,9 ± 0,6	1,3	0,02
2,5	1,2	2,0		–	11,3	11,2 ± 0,2	–1,0	0,02
2,5	0,6	2,0		–	8,3	8,3 ± 0,8	< 1	0,06

Примечание. δ , % – относительная погрешность при $n = 3$, $P = 0,95$.

* В пересчете на число мкМ АК с учетом чувствительности аналитического сигнала к разным компонентам смеси.

Оптимизировать методику анализа путем подбора АДВ (как при анализе «Цитрамона», см. выше) не удастся, так как в данном случае δA не зависит от λ . Очевидно, при определении суммы АО

неаддитивность возникает не из-за образования новых соединений, а из-за снижения выхода окрашенного комплекса. Естественно, влияние этого фактора проявляется при любых длинах волн, точность анализа не зависит от выбора АДВ.

Статистические модели светопоглощения смесей типа D получали при 520 нм в разных концентрационных условиях. В ранее рекомендованных условиях, светопоглощение смесей аскорбиновой кислоты (X_1) и кверцетина (X_2) на уровне $n \cdot 10^{-6}$ М отвечает нелинейной модели. Для прогнозирования ОА в смесях с разным соотношением антиоксидантов была выведена общая формула типа (4.26). Значения ОА удастся предсказать с погрешностью до 30 % отн. Найденная модель показала, что относительная величина ОА должна снижаться при уменьшении содержания антиоксидантов в исследуемом растворе. Этот вывод был подтвержден не только при прогнозировании ОА в компьютерном эксперименте, но и в ходе анализа смесей известного состава. Очевидно, при определении суммарного содержания АО по методу FRAP следует использовать пробы минимального объема, либо заранее сильно разбавлять пробы (вино, сок, чайный настой и т. п.), чтобы снизить суммарное содержание антиоксидантов в реакционной смеси.

3. Дополнительная проверка показала, что *в отсутствие реагента-окислителя* статистические модели светопоглощения смесей антиоксидантов фенольного типа при любых длинах волн являются линейными, даже в области высоких концентраций. Аддитивность аналитических сигналов в области 240–300 нм позволяет определять суммарное содержание антиоксидантов по их собственному поглощению [41]. По-видимому, непосредственного взаимодействия антиоксидантов не происходит и в присутствии окислителя, при определении их суммарного содержания по методу FRAP. Наблюдаемую в этом случае неаддитивность сигналов мы объясняем конкуренцией антиоксидантов при нехватке реагента-окислителя [72; 142]. Это должно замедлять фотометрические реакции и снижать выход окрашенного продукта при фиксированном времени экспозиции. Естественно, при уменьшении суммарного содержания ан-

тиоксидантов реагента-окислителя хватает на все реакции, конкуренция ослабевает, ОА становятся незначимыми, а правильность результатов анализа возрастает. Очевидно, тот же эффект может быть достигнут и при неизменной концентрации антиоксидантов, за счет увеличения начальной концентрации реагента-окислителя. Данное предположение было подтверждено в ходе кинетических исследований, а также при проведении серии ПФЭ. После увеличения объема раствора окислителя в 3–5 раз оптическая плотность растворов, одновременно содержащих 2–3 полифенольных антиоксиданта, адекватно описывается линейными моделями, т. е. становится аддитивной величиной. Обнаруженный с помощью статистических моделей эффект уменьшения ОА при увеличении избытка реагента учитывали, оптимизируя методику определения антиоксидантной активности пищевых продуктов. Увеличение объема реагента-окислителя позволяет снизить или полностью исключить систематическую погрешность при определении суммарного содержания антиоксидантов (табл. 4.4, внизу).

4. *Смеси Е* содержали цис- и трансизомеры N-[(2-оксогексиден)метил]-2-хлорацетамида. Эти соединения получали из 2-(аминометил)циклогексанона, при этом образуется смесь изомеров. Хроматографический анализ смеси не гарантирует правильности результатов: изомеры в ходе их разделения могут переходить друг в друга. Однако такие смеси можно анализировать спектрометрическими методами в УФ- и ИК-областях, не опасаясь сместить таутомерное равновесие. Результаты исследований, проведенных методами УФ- и ИК-спектрометрии, оказались практически совпадающими, а именно проверка по способам 1 и 2 показала, что смесь изомеров N-[(2-оксогексиден)метил]-2-хлорацетамидов обладает аддитивным светопоглощением. Для эквимольных смесей цис- и трансизомеров значения ОА не превышают 5 % и являются статистически незначимыми. Вид градуировочной зависимости для одного из изомеров не меняется в присутствии эквимольных количеств другого. Выявленная для смесей изомеров аддитивность поглощения электромагнитного излучения

в средней ИК-области позволила разработать достаточно простую и экспрессную методику оценки их суммарного содержания, а также методику раздельного определения изомеров без их разделения. Полученные методики были использованы для изучения реакционной способности изомеров.

4.5. Пути уменьшения влияния неаддитивности на правильность оценки c_x

Для уменьшения или устранения влияния неаддитивности сигналов на результаты спектрометрического определения суммарного содержания однотипных аналитов можно предложить несколько способов, а именно:

1. Выяснение и устранение причины неаддитивности светопоглощения.
2. Выбор аналитической длины волны, где отклонения от аддитивности незначимы.
3. Применение метода добавок.
4. Применение градуировочной зависимости (одно- или многомерной), полученной с помощью модельных смесей, состав которых близок к составу исследуемых проб.

Первый способ весьма перспективен, но он требует долгих предварительных исследований, нацеленных на выяснение истинной причины неаддитивности. Только тогда можно будет изменить методику анализа и устранить ОА. Например, в случае образования ионных ассоциатов можно перейти к такому значению рН, при котором X и Y существуют в виде ионов одинакового заряда и ассоциатов не образуют. Можно использовать другой растворитель, препятствующий образованию ассоциатов, и т. п. Если ОА связаны с кинетикой некоторой реакции, можно изменить температуру раствора или продолжительность формирования аналитического сигнала (время экспозиции). Если появление ОА связано с нехваткой реагента на одновременное превращение всех компонентов исследуемой смеси в интенсивно поглощающие соединения (конкуренция за реагент), выходом является увеличение

начальной концентрации реагента, а также разбавление или уменьшение массы или объема пробы [149].

Слабая изученность причин появления ОА делает более реальным второй способ устранения их влияния. К сожалению, не зная причин появления ОА, выбирать длину волны для минимизации этих отклонений приходится эмпирическим методом.

Третий способ (метод добавок) возможен в тех случаях, когда систематические погрешности, возникающие из-за неаддитивности сигналов, имеют мультипликативный характер. Пробы с небольшой добавкой одного из аналитов (или их смеси) и без такой добавки будут давать примерно одинаковые ОА. Следовательно, применение метода добавок должно уменьшить влияние неаддитивности на результат анализа. Однако этот прием дает хорошие результаты далеко не во всех случаях, все зависит от механизма формирования ОА. Так, конкуренция за реагент и связанные с ней отклонения от аддитивности существенно усилятся при введении добавок аналита.

Четвертый способ (построение градуировки по неаддитивным модельным смесям известного состава) представляется наиболее универсальным и перспективным. По-видимому, для повышения точности анализа неаддитивных смесей он был впервые использован Нибергаллом и Маттоксом [150]. Если в спектрах смесей из обучающей выборки проявятся такие же отклонения от аддитивности, как и в спектрах анализируемых смесей, точность определения C резко повысится. Именно это обеспечивает правильные результаты неаддитивных модельных смесей по методу PLS. Применение этого способа может уменьшить и влияние потерь аналитов в ходе пробоподготовки. Именно с этой целью он был использован при разработке новой методики анализа сточных вод [151]. Построение соответствующих многомерных градуировок будет рассмотрено в главе 6.

Глава 5

КАК ПОВЫСИТЬ ТОЧНОСТЬ ОЦЕНОК СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ ОДНОТИПНЫХ ВЕЩЕСТВ?

5.1. Постановка проблемы

Как показано в главе 3, основной причиной, вызывающей неопределенность результатов анализа неразделенных смесей, является внутригрупповая селективность аналитических сигналов. Наибольший вклад в погрешность оценки суммарного содержания любых однотипных веществ вносит именно этот фактор. Результат анализа, выраженный в пересчете на $X_{\text{ст}}$, непредсказуемо отличается от действительной величины суммарного содержания (c_{Σ}). Если пренебречь остальными составляющими общей погрешности (например, случайными погрешностями измерений), то при любом $X_{\text{ст}}$ выполняется соотношение:

$$T^{-1} - 1 \leq \delta c \leq T - 1, \quad (5.1)$$

где δc – возможные значения относительной погрешности (в долях единицы), прогнозируемой в рамках выбранной модели [114], а параметр T характеризует ширину веера градуировок для данной группы веществ и данной методики измерений.

Из (5.1) следует, что предельная погрешность оценки суммарного содержания однотипных веществ равна

$$|\delta c_{\max}| = T - 1. \quad (5.2)$$

При использовании стандарта, отвечающего условию $K_{\text{ст}} = 0,5 (K_1 + K_m)$, неопределенность оценки суммарного содержания существенно снижается [36]. В этом случае

$$|\delta c_{\max}| = (T - 1) / (T + 1). \quad (5.3)$$

Из приведенных формул следует, что полностью устранить систематическую погрешность при $T \neq 1$ нельзя даже при оптимальном выборе стандартного вещества. Предельную погрешность можно снизить до требуемого минимального уровня $\delta c_{\text{крит}}$, выраженного в %, только тогда, когда параметр T не превышает некоторое критическое значение, зависящее от выбора стандарта. Критические значения параметра T показаны в табл. 5.1 [36].

Таблица 5.1

Критические значения параметра T

$\delta c_{\text{крит}}$, % отн.	<i>Произвольный стандарт, расчет по (5.2)</i>	<i>Оптимальный стандарт, расчет по (5.3)</i>
1	1,01	1,02
5	1,05	1,10
10	1,10	1,22
20	1,20	1,50
30	1,30	1,85
50	1,50	3,0

Критические значения T легко вычислить по формулам (5.2) и (5.3) для любых $\delta c_{\text{крит}}$. Правильность формул (5.2) и (5.3) подтверждена в ходе специальных экспериментов [114] с использованием разных способов измерения обобщенного сигнала и разных групп однотипных аналитов (см. подраздел 3.3.4). Значение $T_{\text{крит}}$ можно вычислить и для любого заданного стандарта, у которого коэффициент $K_{\text{ст}}$ отличается от оптимального значения. В этом случае расчеты несколько усложняются; их ведут, как показано в примере 3.2. В ходе расчетов можно учесть и ожидаемую концентрацию стандартного вещества в пробах.

Реальные методики оценки c_{Σ} обычно приводят к гораздо большим значениям T , чем включенные в табл. 5.1. Так, при определении белков с сульфосалициловой кислотой (основной метод определения «общего белка» в российских клинико-диагностических лабораториях) чувствительность определения альбуминов

и глобулинов различается в 4 раза, что ведет к неточности результатов анализа [5]. Не удивительно, что этот удобный и высокочувствительный метод постепенно вытесняется методом, основанным на взаимодействии белков с пирогаллоловым красным ($T \approx 1,4$) [86; 100; 126]. Аналогичный процесс замены селективных методов неселективными⁵ характерен и для лабораторий природоохранного профиля. В частности, для определения суммарного содержания нефтепродуктов в природных и сточных водах вместо одноволновой ИК-спектроскопии все чаще используют менее селективные, а значит – более точные методы многоволновой ИК-спектроскопии. Примером может быть ГОСТ 51797-2001 [21] и его зарубежные прототипы [152; 153 и др.]. К сожалению, суммарное содержание фенолов и ПАВ в водах по-прежнему определяют слишком селективными методами, новые методы определения суммарного содержания этих веществ в лабораториях в последние годы не появлялись.

Проблема не в том, как правильно рассчитать $T_{\text{крит}}$, а каким способом в каждом случае снизить реальную величину T до необходимого уровня $T_{\text{крит}}$. Нивелировать сигналы однотипных веществ так же трудно, как решать обратную задачу, т. е. добиваться высокой селективности сигнала при определении единичного аналита в присутствии родственных веществ. Тем не менее нивелировать сигналы однотипных веществ при оценке их суммарного содержания можно и нужно – это основной способ повышения точности их определения.

С проблемой нивелирования коэффициентов чувствительности сталкиваются многие аналитики, независимо от того, какими объектами они занимаются. Наибольшее внимание нивелированию сигналов уделяют специалисты, определяющие «общий

⁵ Данное утверждение может показаться странным. Но при определении суммарных содержаний однотипных веществ селективность методики – не достоинство, а основной недостаток, в отличие от привычных методик определения индивидуальных аналитов в присутствии мешающих веществ.

белок» в биообъектах. Предложено множество способов нивелирования, все они приводят к повышению точности оценки суммарных содержаний. Набор способов нивелирования зависит от того, какой аналитический метод используют для оценки c_{Σ} . Однако применяемые в разных методах способы нивелирования сигналов похожи. Систематизируем их следующим образом:

- **переход к другому способу формирования сигнала** (замена основного или вспомогательного реагента, введение дополнительных реагентов, оптимизация условий реакции);
- **переход к другому способу измерения сигнала** (переход к другой длине волны, многоволновые измерения, поддиапазонное интегрирование, применение светофильтров и др.);
- **изменение способа расчета интегрального показателя** (переход к другому способу выражения концентраций и др.).

Соответствующие способы нивелирования, предполагающие расчет c^* по заранее построенной одномерной градуировке, будут рассмотрены в разделах 5.2 и 5.3. Некоторые из них удалось применить в анализе реальных объектов (табл. 5.2).

Во всех случаях авторы сообщают о повышении точности оценки c_{Σ} , но полностью устранить внутригрупповую селективность сигналов такими способами обычно не удается.

Нивелирование коэффициентов чувствительности – не единственный, хотя и наиболее эффективный способ повышения точности анализа. Другим способом является обоснованный выбор наиболее подходящего стандартного вещества (см. раздел 5.4). Можно также перейти к более сложным методам расчета, требующим предварительного построения многомерных градуировок. Последний способ весьма сложен и нуждается в специальном программном обеспечении, но он представляется наиболее эффективным средством повышения точности оценки суммарных содержаний. Методы, связанные с применением многомерных градуировок, будут рассмотрены в главе 6. Нивелирование коэффициентов чувствительности позволило разработать несколько новых методик определения суммарного содержания токсикантов

в реальных объектах в пересчете на стандартные вещества. Соответствующие методики и результаты их применения будут кратко описаны в разделе 5.5.

Таблица 5.2

Способы нивелирования коэффициентов чувствительности при оценке суммарного содержания однотипных аналитов с помощью интегральных показателей

<i>Способ нивелирования</i>	<i>Метод анализа</i>	<i>Группа аналитов</i>	<i>Ссылка</i>
Подбор основного реагента	Спектрофотометрия	Белки	[5; 126]
	Спектрофотометрия	Фенолы	[25]
Замена вспомогательного реагента	Спектрофотометрия (FRAP)	Антиоксиданты (полифенолы)	[94]
Введение дополнительного реагента	Спектрофотометрия	Белки	[5; 154]
	Вольтамперометрия	Тиолы	[155]
Изменение концентрационных условий	Спектрофотометрия (FRAP)	Антиоксиданты (полифенолы)	[73]
Увеличение времени экспозиции	Спектрометрия в видимой области	Белки	[100]
Подбор длины волны	Спектрофотометрия	Фенолы	[66]
Измерение сигнала на нескольких длинах волн	ИК-спектрометрия	Углеводороды	[21; 101]
Измерение поглощения полихроматического излучения	ИК-фотометрия	Углеводороды	[123]
Измерение интегральной интенсивности сигнала	ИК-спектрометрия	Углеводороды	[124]
Переход к другому способу выражения концентраций	Рефрактометрия	Углеводы	[115]
	Спектрофотометрия (FRAP)	Антиоксиданты (полифенолы)	[85]

5.2. Оптимизация способа формирования обобщенного сигнала

5.2.1. Выбор основного реагента

Определение суммарного содержания белков. Как уже отмечалось, поиск реагентов, обеспечивающих точную оценку суммарного содержания однотипных веществ, начали специалисты в области клинического анализа. Это было связано с определением показателя «общий белок». Сформулировали даже перечень требований к «идеальному методу» определения белков [86]. Важнейшее из них – независимость результата анализа от качественного и количественного состава смеси белков в исследуемой пробе, что подразумевает одинаковую чувствительность определения разных белков ($T = 1$). Следует учесть, что в моче содержится около 30 белков, основные из них – резко различные по своим свойствам альбумины (А) и глобулины (Г). Соотношение А/Г меняется от пробы к пробе.

Все методы определения «общего белка» разделяют на четыре группы:

1. *«Химические» методы.* Биуретовый метод, основанный на взаимодействии ионов меди(II) с пептидными группами, имеющимися в любом белке, неселективен, точен, но недостаточно чувствителен. Необходимость предварительного концентрирования белков делает биуретовый метод непригодным для массового применения. Гораздо более чувствителен метод Лоури, основанный на взаимодействии реактива Фолина с некоторыми аминокислотами, входящими в структуру белковых макромолекул (триптофан, тирозин). Однако этот метод сейчас не применяют, так как различия аминокислотного состава белков приводят к высокой селективности сигналов ($T = 300$ [5]) и недопустимо большим погрешностям анализа.

2. *Турбидиметрические методы,* основанные на образовании взвеси продуктов взаимодействия белков с осадителями, например сульфосалициловой кислотой. Метод ССК весьма чувств-

вителен, но слишком селективен ($T \approx 4$) и, к тому же, плохо воспроизводим (влияние скорости осаждения и размера образующихся частиц). За рубежом метод ССК не применяют, так как одинаковый результат анализа у двух пациентов может быть получен по этому методу даже при трехкратном различии суммарного содержания белков, и наоборот.

3. *Фотометрические методы*, основанные на образовании растворимых комплексов с красителями (кумасси голубой и др.). Состав, устойчивость и оптические свойства продуктов этих реакций недостаточно изучены. Методики высокочувствительны, сигналы альбуминов примерно в 1,7 раза выше сигналов глобулинов и иммуноглобулинов.

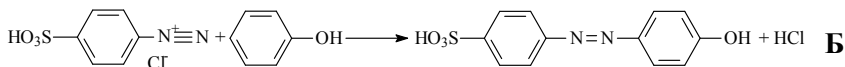
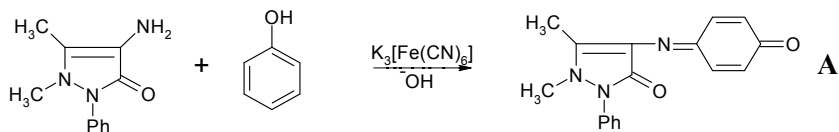
4. Последнюю, наиболее перспективную и широко применяемую группу реагентов составляют кислотно-основные индикаторы. Лучшими считают пирогаллоловый красный (ПГК) и бромтимоловый синий [86; 100]. Индикатор вводят в избытке, обычно в катионной форме. Под действием белков образуется анионная форма, поглощение которой измеряют в видимой области спектра. Контрастность реакции белков с ПГК улучшается в присутствии молибдат-ионов. Чувствительность определения довольно высока. Градуировки линейны в области от 0,05 до 2,0 г/л. Коэффициент вариации – не более 5 %.

Фотометрические методы, основанные на взаимодействии белков с индикаторами, особенно с ПГК, имеют низкую селективность, т. е. обеспечивают точную оценку суммарного содержания белков. В оптимизированных условиях отношение сигналов альбуминов и глобулинов для метода ПГК составляет, по разным данным, 1,3–1,5. Параметр T может быть еще более снижен путем введения дополнительных реагентов, в частности ПАВ [5]. Погрешность определения зависит от выбора стандарта (калибратора), но, как показывает анализ стандартных образцов, даже с правильно выбранным калибратором величина δc может достигать до 30 % отн. Единственным недостатком метода ПГК является сильное влияние многих лекарственных веществ, которые выводятся

из организма больного одновременно с белками. Для устранения влияния лекарственных веществ и продуктов их распада требуется сильное разбавление пробы и/или трудоемкие процедуры хроматографического разделения соответствующих смесей.

Поиск новых индикаторов для спектрофотометрического определения «общего белка» продолжается [126]. Критерием сравнения реагентов является отношение чувствительности определения альбуминов и глобулинов, играющее в данном случае роль параметра T .

Определение суммы фенолов. Другим примером целенаправленного подбора реагента, обеспечивающего одинаковую чувствительность определения разных аналитов, может быть определение фенолов. Обычно смесь фенолов, содержащихся в пробе (например, в природной или сточной воде), в конце пробоподготовки переводят в однотипные интенсивно окрашенные дериваты. Затем измеряют оптическую плотность полученного раствора при выбранной длине волны и рассчитывают ИП по линейному градуировочному графику, построенному по растворам стандартного вещества – простейшего фенола C_6H_5OH – после его дериватизации. Для получения окрашенных производных используют реакции **A** или **B** [24]. На схеме обе реакции показаны применительно к определению одного и того же аналита – простейшего фенола. В качестве реагентов, используемых в реакциях **A** и **B**, взяты 4-аминоантипирин и диазотированная сульфаниловая кислота, эти реагенты типичны и довольно хорошо изучены.



Реакция А лежит в основе стандартных методик измерения фенольного индекса, например методик [23; 156]. При прочих равных условиях величина ФИ (c^* , мг/дм³) тем выше, чем выше суммарное содержание фенолов (c_{Σ}). Суммарное содержание фенолов можно оценить и с помощью реакции Грисса (Б). Вместо ДСК в качестве реагента можно взять диазотированный паранитроанилин [157] или некоторые другие амины [21]. В практике гидрохимического анализа в настоящее время реакцию Грисса для определения фенолов применяют довольно редко.

Свойства двух фотометрических реагентов – 4-аминоантипирина и ДСК – как групповых реагентов для определения суммы фенолов были сопоставлены в специальном эксперименте [25]. В качестве модельных соединений были взяты собственно фенол (Ф), крезолы (ОК и МК), нафтолы (Н1 и Н2) и резорцин (Р). Реакцию А проводили по методике [158, с. 374], реакцию Б – по методике [157, с. 77]. Градуировочные графики строили по растворам индивидуальных фенолов после их перевода в одготипные окрашенные производные. Оказалось, что спектры хинониминовых красителей, полученных из разных фенолов по реакции с 4-аминоантипирином, различаются сильнее, чем спектры азокрасителей, полученных из тех же фенолов по реакции с ДСК. Параметр T для хинониминовых красителей при 490 нм оказался равным 4,0, а для азокрасителей при той же длине волны он равен 3,0. Из тех же фенолов готовили модельные смеси, содержавшие 2–3 соединения в соизмеримых концентрациях. После дериватизации измеряли обобщенные сигналы фенолов в смесях (разбавленных водных растворах) и пересчитывали их на молярную концентрацию C_6H_5OH по ранее построенным градуировочным графикам.

При использовании реакции А оценки c_{Σ} оказались хорошо воспроизводимыми, но всегда сильно заниженными. В некоторых случаях значения ФИ были в 5–8 раз ниже действительного содержания фенолов. Это согласуется с опубликованными в научной литературе данными [26]. Вероятно, заниженные оценки суммарного содержания фенолов объясняются меньшей чувствительно-

стью определения замещенных, многоатомных и полициклических фенолов по сравнению со стандартным веществом (простейшим фенолом). Причиной могла быть и неаддитивность сигналов из-за взаимодействия фенолов в ходе их дериватизации. Однако значимые отклонения от аддитивности были выявлены лишь для немногих смесей. Они были как положительными, так и отрицательными, а их величина не превышала 20 % отн. (по модулю). С другой стороны, погрешности анализа всегда отрицательны, а значения $|\delta C|$ нередко превышают 50 % отн. Следовательно, при использовании реакции **A** неаддитивность сигналов не может быть основной причиной заниженных оценок c_{Σ} .

*При использовании реакции **B** результаты анализа смесей в пересчете на фенол оказались гораздо более правильными. Без оптимизации условий анализа суммарные содержания фенолов (в моль/дм³) в модельных смесях оценивали с погрешностями, не превышающими 60 % (по модулю). После оптимизации условий реакции и способа измерения они снизились до уровня 20 %, а в большинстве случаев не превышали 10 %. Оптимизированные условия характеризуются значениями T порядка 1,3–1,5.*

Судя по результатам этого эксперимента, измеренные по стандартным методикам с применением 4-аминоантипирина значения ФИ природных и сточных вод в пересчете на фенол должны быть существенно ниже суммарных содержаний фенольных соединений в тех же водах. Таким образом, определение фенольного индекса ведет к недооценке фенольного загрязнения водоемов. Сопоставительный анализ некоторых сточных вод фотометрическим методом и методом ВЭЖХ [26] подтверждает этот вывод. Составители американского стандарта ASTM D1783-01(2007) также считают ФИ не истинной, а минимальной концентрацией фенолов в исследуемой воде [156].

Степень проявления различий между c^* и c_{Σ} должна зависеть от состава смеси фенолов в исследуемой пробе. В частности, сточные воды целлюлозно-бумажных комбинатов содержат довольно мало C_6H_5OH , но много гваякола и других продуктов деструкции

лигнина [159], малоактивных в реакции А. В подобных случаях о загрязненности воды фенольными соединениями нельзя судить по величине ФИ. Лучшие результаты могут быть получены с применением реакции Б, особенно при проведении ее в условиях, нивелирующих чувствительность определения разных фенолов. На основе реакции фенолов с ДСК была разработана и запатентована новая методика определения фенолов в водах [66], имеющая существенные преимущества по сравнению с методиками определения ФИ (см. подраздел 5.5.1).

5.2.2. Подбор вспомогательных реагентов

При формировании аналитических сигналов однотипных веществ с помощью какой-либо фотометрической реакции внутригрупповая селективность зависит не только от природы основного реагента, но и от того, какие еще вещества участвуют в формировании обобщенного сигнала. Подбирая вспомогательный реагент, можно снизить селективность и повысить чувствительность реакции. Целенаправленно используют этот прием редко, но все же и российские, и турецкие исследователи с успехом применили его при оценке антиоксидантной активности пищевых продуктов по методу FRAP. В этом методе сигналы разных антиоксидантов-восстановителей (например, полифенолов) измеряют в видимой области спектра после взаимодействия полифенолов с избытком железа(III) и получения окрашенного продукта реакции (комплекса железа(II) и вспомогательного реагента R). Первоначально в качестве R использовали трипиридилтриазин, образующий комплексы как с окисленной, так и с восстановленной формой железа [72]. Формальный редокс-потенциал системы железа в этих условиях составляет около 0,7 В [94], что ненамного превышает формальные редокс-потенциалы антиоксидантов. Некоторые антиоксиданты в присутствии трипиридилтриазина вообще не определяются (глутатион, цистеин), другие реагируют не полностью или очень медленно [160]. Чтобы сделать метод более универсальным, авторы статьи [160] оптимизировали концентрационные условия

и увеличили время экспозиции (так называемый улучшенный метод FRAP). Позднее было предложено заменить трипиридилтриазин *o*-фенантролином или 2,2'-дипиридиллом, которые образуют прочные и интенсивно окрашенные комплексы преимущественно с железом(II) [161]. В этом случае формальный редокс-потенциал системы железа становится более положительным (в присутствии *o*-фенантролина – 1,19 В; в присутствии 2,2'-дипиридила – 0,97 В), что значительно превышает редокс-потенциалы любых полифенолов и способствует полноте протекания редокс-реакций. В присутствии *o*-фенантролина методом FRAP удастся определять даже такие малоактивные антиоксиданты, как глутатион и цистеин; правда, с меньшей чувствительностью, чем полифенолы. Вместе с тем в присутствии указанных лигандов редокс-потенциал системы железа не поднимается до такой степени, чтобы окислять сопутствующие полифенолам компоненты пищевых продуктов, не являющиеся антиоксидантами в условиях *in vivo*. Углеводы и другие слабые восстановители в присутствии фенантролина или дипиридила не определяются.

Авторы работы [94] справедливо указывают, что целенаправленное введение тех или иных лигандов, связывающих ту или иную форму железа в комплексы разной прочности, позволяет регулировать редокс-потенциал системы железа таким образом, чтобы обеспечить селективное определение той или иной группы восстановителей, в том числе ЕТ-антиоксидантов. Дополнительным преимуществом является повышение чувствительности и сдвиг полос поглощения продукта реакции в шкале длин волн. Вводя тот или иной лиганд, можно устранить спектральные наложения и тем самым устранить мешающее влияние растительных пигментов, обычно сопутствующих антиоксидантам.

В работах К. Berker и соавторов [94; 95] были определены коэффициенты чувствительности семи антиоксидантов, преимущественно полифенолов, в одних и тех же условиях, но в присутствии разных R – *o*-фенантролина, батофенантролина, феррозина, трипиридилтриазина и др. Конструируя выборки коэффициентов

чувствительности, включающие разные антиоксиданты, можно рассчитать параметр T для каждого R. Найденные значения T зависят от природы вспомогательного реагента, а именно: для улучшенного варианта метода FRAP с трипиридилтриазином параметр T равен 4,31, для *o*-фенантролина – 4,16; для феррозина – 3,97; для батофенантролина – 3,65. Влияние 2,2'-дипиридила исследовалось при несколько меньшем времени экспозиции (10 мин), в этом случае $T = 3,0$ [85]. К сожалению, данные, позволяющие сравнить точность оценки суммарного содержания антиоксидантов в присутствии разных вспомогательных веществ, авторами не приведены.

Из приведенных данных видно, что замена вспомогательного реагента меняет селективность определения антиоксидантов, хотя и не очень сильно. Этот прием более важен в других отношениях – с его помощью можно добиться одновременного появления сигналов всех аналитов данной группы, а не только наиболее активных представителей этой группы. Можно снизить влияние посторонних веществ, увеличить чувствительность методики, увеличить диапазон линейности градуировочных графиков и т. п. Возможно, замена вспомогательных реагентов при измерении других интегральных показателей позволит нивелировать чувствительность определения однотипных веществ более эффективно, чем в методе FRAP.

5.2.3. Добавление нивелирующих реагентов

Авторы ряда методик, разработанных для оценки c_x в пересчете на стандартное вещество, целенаправленно вводили в реакционную смесь твердые носители, что повышало чувствительность методики или делало ее более удобной для массового применения. Примером может быть иммобилизация реагентов на твердых носителях или в прозрачной пленке. Этот прием неоднократно использовали при определении антиоксидантной активности (примером может быть патент [162]). При определении «общего белка» широко применяют иммобилизацию реагентов на бумаге (диагностические полоски для скрининга) [5]. Однако на

внутригрупповую селективность иммобилизация реагентов на носителе не влияет.

Лишь немногие исследователи целенаправленно вводили в реакционную смесь дополнительные реагенты, нивелирующие чувствительность определения однотипных веществ. В частности, при спектрофотометрическом определении «общего белка» по реакции с пирогалловым красным в реакционную смесь добавляют додецилсульфат натрия [154; 163]. Первоначально этот прием использовали лишь для улучшения воспроизводимости измерений. Однако оказалось, что добавка додецилсульфата нивелирует чувствительность определения альбуминов и глобулинов с ПГК, особенно при высоком соотношении А/Г, что обеспечивает приблизительно правильную оценку суммарного содержания белков при некоторых заболеваниях. Так, анализируя сыворотку крови больных миеломой, определяя суммарное содержание белка в пересчете на альбумин и сопоставляя результаты с надежной референтной методикой, французские исследователи установили, что результаты определения «общего белка» методом ПГК занижены на 37 %. Повторные анализы тех же проб с реагентом ПГК, содержащим добавку додецилсульфата натрия, были занижены лишь на 17 %. Авторы предположили, что при добавлении додецилсульфата натрия происходит разворачивание полипептидных цепей глобулинов и высвобождение дополнительных аминокрупп, которые и вступают в реакцию с ПГК. В итоге коэффициенты чувствительности для определения альбуминов и глобулинов сближаются.

Еще более эффективным оказалось введение дополнительного реагента при инверсионно-вольтамперометрическом определении суммарного содержания опасных токсикантов – алкилтиолов (меркаптанов) [155]. Известно, что в сточных водах целлюлозно-бумажных производств, в воздухе и в растительных материалах одновременно может присутствовать несколько тиолов $C_4 - C_7$, в частности гексантиол. Содержание каждого из них в отдельности можно определить инверсионно-вольтамперометриче-

ским методом на ртутно-пленочном электроде. Тиолы накапливаются на поверхности ртути за счет адсорбционных процессов, при этом образуются меркаптиды ртути. Пики восстановления меркаптидов ртути для всех изученных представителей гомологического ряда наблюдались при одном и том же потенциале – 0,6 В. Значения же аналитических сигналов при одинаковой молярной концентрации разных меркаптанов достоверно различаются. Для ряда $C_4 - C_5 - C_7$ сигналы соотносятся как 8:11:28, что не позволяет точно определять суммарное содержание этих токсикантов. С другой стороны, чувствительность определения индивидуальных тиолов недостаточна для определения их на уровне ПДК ($n \cdot 10^{-10}$ М).

При добавлении в электрохимическую ячейку избытка ионов ртути(II) чувствительность вольтамперометрического определения тиолов увеличивается на два порядка, что позволяет определять их в природных водах на уровне ПДК. По-видимому, тиолы полностью переходят в быстровосстанавливающиеся меркаптиды ртути. При этом чувствительность определения разных тиолов не только возрастает, но и становится одинаковой, соответствующие точки ложатся на один и тот же градуировочный график. Обобщенный сигнал аддитивен. Концентрация нивелирующего реагента – ионов ртути(II) – не влияет на степень совпадения сигналов разных тиолов. Наибольшая чувствительность определения суммы тиолов наблюдается при введении нивелирующего реагента на уровне 10^{-7} М (рис. 5.1). Авторы описали вероятный механизм процесса, объясняющий рост чувствительности и нивелирование сигналов в присутствии ионов ртути(II).

Суммарное содержания тиолов в некоторой смеси можно выразить в пересчете на любой тиол; полученные результаты анализа (на уровне 10^{-9} М) приблизительно совпадают. Результаты анализа характеризуются систематической погрешностью, не превышающей 10 %, при коэффициенте вариации 10–20 %. Таким образом, систематическая погрешность определения суммы тиолов, вызванная внутригрупповой селективностью сигналов, в резуль-

тате введения нивелирующего реагента становится незначимой. Работа [155] – пожалуй, единственный случай полного исключения влияния внутригрупповой селективности на результат анализа. Успеху помогло высокое сходство определяемых веществ (гомологов).

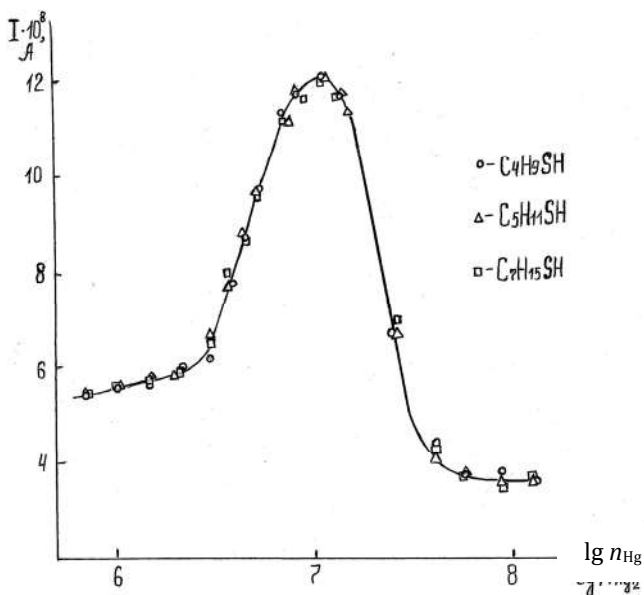


Рис. 5.1. Зависимость величины аналитического сигнала тиаолов (C_4 , C_5 , C_7) от количества добавленных ионов ртути (I)

5.2.4. Варьирование концентрационных условий

Отношение максимального и минимального коэффициентов чувствительности, полученных для некоторой выборки однотипных веществ с помощью одной и той же методики, может быть параметром оптимизации при подборе оптимальных условий анализа. Факторами в таких исследованиях могут быть концентрации реагентов, величина pH, продолжительность экспозиции и т. п. Рассмотрим в качестве примера эмпирический подбор оптималь-

ных условий анализа при определении суммарного содержания фенолов по реакции с ДСК [66].

В ходе эксперимента меняли условия взаимодействия фенолов с ДСК (время экспозиции и pH раствора). Постоянные значения имели общая концентрация фенолов, избыток реагента (10:1) и длина волны, при которой измеряли обобщенный аналитический сигнал разных фенолов (360 нм). В ходе оптимизации добивались максимального сближения чувствительности определения разных фенолов ($T \rightarrow 1$). Одновременно контролировали воспроизводимость измерений и пределы обнаружения индивидуальных фенолов, не допуская, чтобы снижение параметра T приводило к ухудшению других метрологических характеристик методики. Как видно из рис. 5.2, минимальное значение параметра T наблюдается, если проводить реакцию в зоне значений $\text{pH} = 7,0 \div 8,5$.

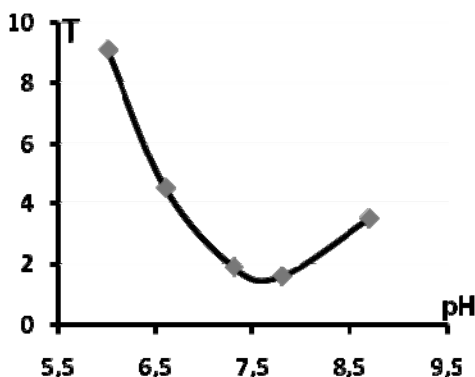


Рис. 5.2. Зависимость параметра T от pH раствора при оценке суммарного содержания фенолов по реакции с ДСК ($\lambda = 360$ нм, время экспозиции 10 мин)

Вне этого интервала коэффициенты чувствительности разных фенолов различаются сильнее, чем в оптимальных условиях, что можно объяснить неблагоприятными условиями для проведения реакции азосочетания. А именно, при $\text{pH} < 7$ чувствительность определения фенолов снижается вследствие неполного протекания

реакции азосочетания, по крайней мере для части фенолов. При $pH > 8,5$ начинается разрушение некоторых из ранее образовавшихся азокрасителей (наименее устойчивых). В обоих случаях различия в поведении разных фенолов усиливаются. В дальнейшем реакцию с ДСК проводили при $pH = 7,3$, в среде бикарбонатного буферного раствора.

На следующем этапе оптимизации было установлено, что при прочих постоянных условиях параметр T возрастает, если для взаимодействия ДСК со смесью фенолов отводится менее 5 или более 30 мин. В первом случае начинают проявляться различия в кинетике образования разных азокрасителей, во втором случае – начинается разрушение некоторых ранее образовавшихся красителей. Кроме того, снижение экспозиции (менее 5 минут) ухудшает воспроизводимость результатов анализа. Оптимальное время экспозиции – от 5 до 30 мин. Затем оптимизировали условия измерения обобщенного сигнала (длину волны). Минимальное значение T было получено при $\lambda = 360$ нм.

При одновременном использовании оптимизированных значений всех факторов ширина веера градуировок снизилась (рис. 5.3) вплоть до $T = 1,3$, а чувствительность определения фенолов несколько возросла. Это привело к существенному уменьшению систематических погрешностей (табл. 5.3). Заметим, что многофакторная и многопараметрическая задача, которая в данном исследовании была решена методом поэтапной оптимизации, идеально подходит для одновременного варьирования всех факторов и проведения полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа 2^3 . Это следует учесть другим исследователям, поскольку рассмотренная задача является весьма типичной, а метод ПФЭ позволяет найти оптимальные условия реакции надежнее, чем поочередное варьирование факторов.

Аналогичную процедуру подбора условий анализа с использованием T в качестве параметра оптимизации можно использовать для других групп однотипных веществ, других интегральных показателей и других оптимизируемых факторов.

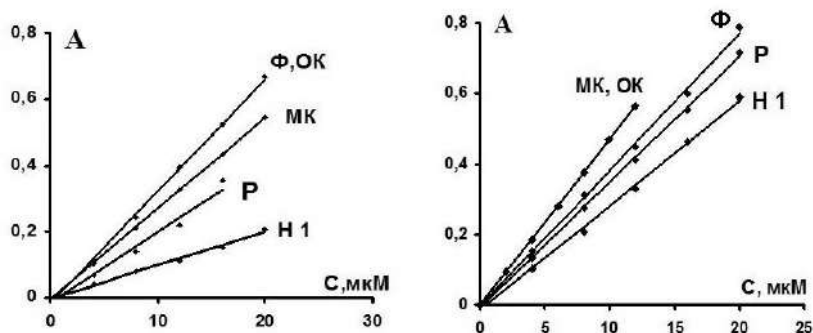


Рис. 5.3. Вееры градуировок при определении фенолов по реакции азосочетания с ДСК. Слева: до оптимизации ($\lambda = 450$ нм, $\text{pH} = 8,3$); справа: после оптимизации ($\lambda = 360$ нм, $\text{pH} = 7,3$)

Таблица 5.3

Относительные погрешности (δc , %) при определении суммарного содержания фенолов в модельных смесях до и после оптимизации методики [65]

Фенол	Молярное соотношение компонентов	δc , %	
		до оптимизации	после оптимизации
Ф – ОК	1:1	10,5	2,5
МК – ОК	1:1	28,6	17,9
МК – Н	1:1	–48,0	–5,0
Ф – МК – Н	1:3:1	–49,7	–8,2
Ф – МК – ОК	3:1:1	16,2	9,3

Примечание. Во всех смесях $c_{\Sigma} = 12$ мкМ.

Рассмотренные в данном разделе методические приемы можно рассматривать как «химические» способы управления селективностью обобщенных аналитических сигналов. Однако они применимы далеко не всегда. В частности, при определении суммы углеводородов они не пригодны, так как сигнал формируется без проведения каких-либо реакций. В этом и многих других случаях нужны «физические» способы. Они будут рассмотрены в разделе 5.3.

5.3. Выбор способов измерения сигнала и расчета интегрального показателя

5.3.1. Выбор метода определения суммарного содержания углеводов⁶

Общая характеристика методов. Как отмечалось в подразделе 1.5.1, для определения суммарного содержания УВ в водах широко применяют ИК-спектрометрические методы, поскольку в ИК-области можно измерить сигналы любых УВ. Все ИК-спектрометрические методы требуют предварительного выделения суммы УВ из исходной пробы, для этого используют экстракцию и/или сорбцию (см. рис. 1.4). При этом отделяются неуглеводородные компоненты. Обобщенный аналитический сигнал УВ – оптическая плотность очищенного экстракта – прямо пропорционален искомому суммарному содержанию УВ в пробе (c_{Σ}).

Альтернативные варианты определения УВ – УФ-спектрометрия и флуориметрия – не обеспечивают точную оценку c_{Σ} , так как в рамках этих методов аналитические сигналы создают далеко не все аналиты. Результаты УФ-спектрометрического и особенно флуориметрического анализа сильно зависят от непредсказуемого состава смеси УВ, присутствующей в единичной пробе. Разумеется, как метод количественного определения углеводов, ИК-спектрометрия тоже имеет свои недостатки [3; 57]. Ими считают невысокую чувствительность определения (даже на самых лучших приборах обычно не удается определять УВ на уровне ниже 0,1 мг/л) и необходимость использования токсичных растворителей. В области поглощения С-Н связей для ИК-излучения прозрачны лишь тетрахлорметан и некоторые фторсодержащие растворители. Тем не менее в настоящее время количественная ИК-спектрометрия является основным методом определения нефтепродуктов в водах и быстро развивается. Спектры поглощения индивидуальных УВ довольно хорошо изучены [122], спектр любого УВ можно с хорошей точностью рассчитать квантовохимическими методами [164]. Рас-

⁶ Подраздел подготовлен при участии М.А. Федоровой.

тет выпуск надежных и относительно недорогих приборов, в том числе специальных концентраторов для определения суммарного содержания УВ. Разработан ряд удачных стандартных методик (например, [21]), начат выпуск государственных стандартных образцов с аттестованным суммарным содержанием УВ. Тем не менее выбрать оптимальную методику определения суммы УВ трудно. Существуют три принципиально разных способа измерений обобщенного сигнала: одноволновая ИК-спектрометрия, многоволновая ИК-спектрометрия и ИК-фотометрия. В последнем случае используют концентраторы, усредняющие сигнал в некотором диапазоне длин волн, выделенном интерференционным светофильтром (рис. 3.3). Очевидна аналогия концентраторов с фотоэлектроколориметрами, которые измеряют сигналы, усредненные в некотором диапазоне длин волн в видимой области спектра. Для контроля загрязнения водоемов нефтепродуктами в США преимущественно применяют одноволновую ИК-спектрометрию и хроматографию, в Евросоюзе – многоволновую ИК-спектрометрию, а в России и КНР – ИК-фотометрию. Точность соответствующих методик определяется способом регистрации сигналов. Однако имеющиеся в литературе сведения о точности и чувствительности многих методик вызывают серьезные сомнения, а объективное сопоставление аналитических возможностей разных вариантов ИК-спектрометрии не проводилось.

Для повышения точности определения суммарного содержания УВ ранее использовали эмпирический подбор $X_{ст}$, однако этот способ оказался недостаточно эффективным. В поисках способа снижения внутригрупповой селективности в ОмГУ были проведены специальные исследования, результаты которых приведены в статьях [101; 123].

Внутригрупповая селективность сигналов при разных способах их измерения. ИК-спектры растворов разных УВ в тетрахлорметане снимали на ИК-фурье-спектрометре FT-801. Для однотипных УВ (например, разных аренов) положения спектральных максимумов в шкале волновых чисел (ν , см^{-1}) несколько раз-

личаются, что ведет к различию удельных коэффициентов поглощения (K_i) при фиксированном значении волнового числа ν .

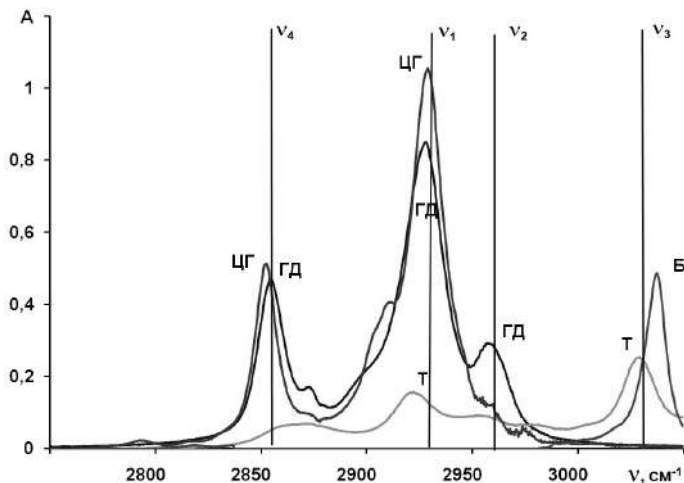


Рис. 5.4. Спектры поглощения растворов некоторых индивидуальных УВ в CCl_4 . Концентрации (мг/дм^3): циклогексан (ЦГ) – 31; гексадекан (ГД) – 29; бензол (Б) – 94; толуол (Т) – 88

Еще сильнее различаются при $\nu = \text{const}$ значения K_i *разнотипных* УВ и, следовательно, их пределы обнаружения. Так, при 2930 см^{-1} удельные коэффициенты поглощения *n*-тетрадекана, циклогексана и толуола составляют 6,5, 6,0 и 0,40 л/г·см соответственно, а пределы обнаружения этих УВ в отсутствие мешающих веществ – 0,05, 0,05 и 0,8 мг/дм^3 . Разная чувствительность определения индивидуальных УВ при любом способе измерения сигнала приводит к образованию веера градуировок (рис. 5.5). Различия в чувствительности определения разнотипных УВ наиболее выражены в случае одноволновой ИК-спектрометрии, слабее – в ИК-фотометрии и в наименьшей степени (при правильном выборе условий измерений) – в случае многоволновой ИК-спектрометрии. Так, для некоторой выборки, включающей 9 разных УВ (алканы, циклоалканы и алкиларены), параметр T при 2930 см^{-1} составил

16,3 единиц. Для той же выборки ИК-фотометрия (прибор ИКН-025) приводит к $T=2,3$, а многоволновая ИК-спектрометрия со специально подобранными весовыми коэффициентами к $T=1,2$. Таким образом, внутригрупповая селективность сигналов УВ в ИК области в значительной степени определяется способом измерения этих сигналов.

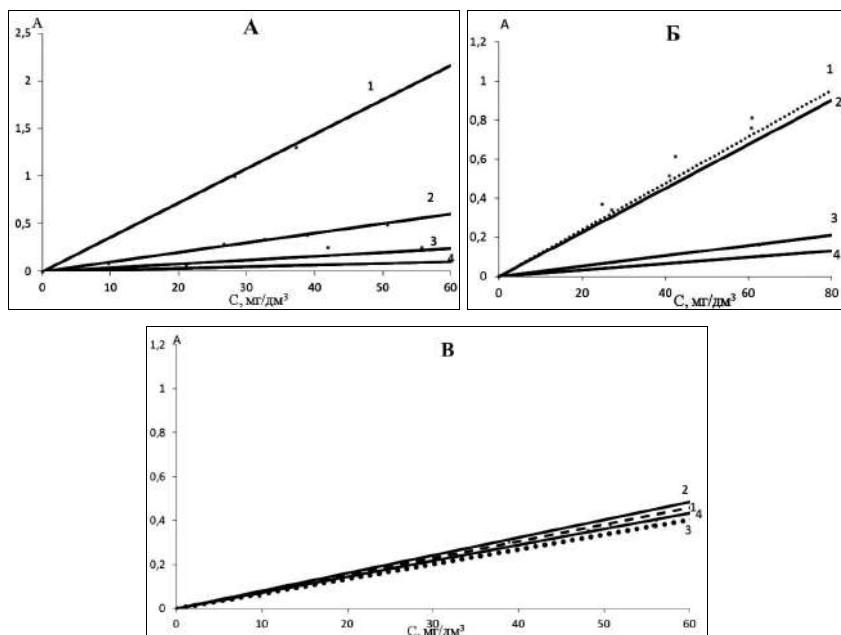


Рис. 5.5. Одномерные градуировочные зависимости ряда УВ при разных способах измерения аналитического сигнала:

А – одноволновая ИК-спектрометрия при 2930 см^{-1} ; Б – ИК-фотометрия; В – многоволновая ИК-спектрометрия (обобщение измерений при $2855, 2930, 2960$ и 3030 см^{-1}); 1 – циклогексан; 2 – изооктан; 3 – *n*-килол; 4 – толуол

Другие метрологические характеристики соответствующих методик (характеристики прецизионности, чувствительности, экспрессности; влияние посторонних веществ) также различаются, их следует принимать во внимание при выборе методики.

Погрешности оценки суммарных содержаний. Было приготовлено несколько десятков модельных смесей точно известного состава, содержащих от 2 до 5 индивидуальных УВ в среде CCl_4 ($c_{\Sigma} < 150 \text{ мг/дм}^3$). Максимальные значения светопоглощения смесей обычно наблюдали вблизи 2855, 2930, 2960 и 3030 см^{-1} . Независимо от природы и соотношения компонентов, обобщенный сигнал нескольких УВ (A_{Σ}) при $\nu = \text{const}$ оказался аддитивной величиной, т. е. ИК-спектры углеводородных смесей представляют собой суперпозиции спектров индивидуальных УВ. Отклонения от аддитивности оказались незначимыми и при других способах измерения сигналов (ИК-фотометрия, многоволновая ИК-спектрометрия). Следовательно, неаддитивность светопоглощения не может быть источником систематической погрешности при оценке содержания УВ, независимо от способа измерения сигнала.

Погрешности анализа каждой смеси известного состава рассчитывали по формуле (2.1). Погрешности анализа ряда (m) смесей характеризовали обобщенно, используя принятый в хемометрике параметр $RMSEP$ [15]:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m (c_j^* - c_{\Sigma j})^2}{m}}, \quad (5.4)$$

где c_j^* и $c_{\Sigma j}$ – найденное и действительное суммарное содержание УВ в j -й смеси.

Для каждой смеси значение δc сравнивали с прогнозируемым значением систематической погрешности $\delta c_{\text{теор}}$, полученным, как описано в разделе 3.2. Прогнозируемые значения систематических погрешностей при любом способе измерений соответствовали погрешностям, выявленным для тех же смесей в ходе эксперимента, расхождения не превышают 15 %. Пример – табл. 5.4, полученная с применением одноволновой ИК-спектрометрии. Выявленные расхождения отражают неучтенное влияние случайных погрешностей.

Таблица 5.4

**Анализ модельных смесей УВ при 2930 см⁻¹:
прогнозы и эксперимент**

<i>Состав смеси</i>	<i>Соотношение концентраций</i>	<i>c_Σ, мг/дм³</i>	<i>c*, мг/дм³</i>	<i>W, %</i>	<i>δс, %</i>	<i>δс_{теор}, %</i>
n-Гексан, толуол	3:1	102	99	3	-3	-5
	1:1	99	68	0,5	-31	-32
	1:3	101	44	1	-57	-58
Толуол, циклогексан	3:1	101	66	0,1	-35	-28
	1:1	104	121	3	16	28
	1:3	102	180	0,3	77	85
Толуол, n-гексан, циклогексан	3:1:1	101	77	2	-23	-18
	1:1:1	94	119	2	26	25
	1:2:3	97	159	1	64	63

Хорошее совпадение прогнозируемых и реальных погрешностей наблюдалось и при других способах измерения A_{Σ} , в частности при использовании концентратомера ИКН-025.

Возможность прогнозирования погрешностей по формуле (3.10) убедительно подтверждает гипотезу о том, что основной причиной появления погрешностей при ИК-спектрометрической оценке содержания УВ является различие удельных коэффициентов поглощения индивидуальных УВ. Внутригрупповая селективность сигналов является основным источником возникновения систематических погрешностей, независимо от состава углеводородной смеси и способа измерения обобщенного аналитического сигнала.

Очевидно, для получения точных оценок суммарного содержания УВ надо нивелировать удельные коэффициенты поглощения индивидуальных УВ. В рамках метода одноволновой ИК-спектрометрии сделать это не удалось. Варьирование АДВ, позволившее существенно снизить внутригрупповую селективность фенолов, в данном случае не помогло. Переход от рекомендуемого в литературе значения 2930 см⁻¹ к другим значениям вол-

новых чисел не снижал, а повышал параметр T . Одновременно повышались пределы обнаружения углеводородов. Единственным возможным способом снижения систематических погрешностей оказался переход к иным способам измерений – ИК-фотометрии и особенно многоволновой ИК-спектрометрии. Как видно из рис. 5.5 и табл. 3.2, эти методы менее чувствительны к составу углеводородных смесей.

Заметим, что одноволновая ИК-спектрометрия может быть прекрасным методом оценки суммарного содержания УВ *заданного типа*, например алканов (или аренов). По нашим данным, результаты определения суммарного содержания алканов, выраженные в пересчете на смесь Симарда, примерно соответствуют действительному суммарному содержанию этих УВ, независимо от способа измерения сигнала и от соотношения компонентов. Так, анализ смеси, содержащей 33 % *n*-гексана и 67 % изооктана, приводит к $\delta c = -8,3$ % для ФТ-801 и к $\delta c = 2,5$ % для ИКН-025. Очевидно, оба способа измерения сигнала позволяют приблизительно правильно оценить суммарное содержание алканов, и смесь Симарда вполне отвечает этой задаче. Приблизительно правильные результаты получали и в ходе анализа смесей, содержащих, кроме алканов, небольшие количества циклоалканов или алкиларенов (не более 10 % отн.). Но в реальных условиях в состав углеводородных смесей входят всевозможные УВ, причем состав смесей непредсказуем. После попадания УВ в водоем он быстро меняется.

Чувствительность и прецизионность определения УВ.

Повторные измерения аналитического сигнала для любого заранее приготовленного раствора углеводородов при любом способе измерений приводят к коэффициентам вариации, не большим 1 % (при условии, что $0,02 < A_{\Sigma} < 1,8$). В случае анализа повторно приготовленных смесей одинакового номинального состава коэффициенты вариации (W) существенно возрастали, доходя иногда до 3–4 %. Можно отметить тенденцию к более высоким значениям W для ИК-фотометрии, но статистически достоверные различия выборок не выявлены. Случайные погрешности результатов анализа

реальных гидрохимических объектов могут быть еще большими (до 10 % отн.), но их будут определять операции пробоотбора, экстракционного извлечения и сорбционной очистки экстракта, а не способ измерения сигнала.

Для всех УВ градуировочные графики линейны вплоть до 140 мг/л, независимо от способа измерения сигнала. Коэффициенты корреляции превышают 0,99, фоновое поглощение статистически не значимо. Более высокая чувствительность и несколько лучшая сходимость измерений, выполненных методом одноволновой ИК-спектрометрии, приводят к более низким пределам обнаружения (C_{\min}) одних и тех же соединений по сравнению с другими способами. По усредненным данным, величина C_{\min} при 2930 см^{-1} составляла $0,67\text{ мг/дм}^3$, а для ИК-фотометрии и многоволновой ИК-спектрометрии – в несколько раз выше (точные значения C_{\min} зависят от набора используемых длин волн). Очевидно, ни один из методов не позволяет определять УВ на уровне ПДК без экстракционного или сорбционного концентрирования. Количественное определение УВ в природных водах на уровне ПДК с применением одноволновой ИК-спектрометрии требует концентрирования УВ в 20–30 раз, а при использовании других методов – не менее чем в 100 раз.

Из проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Представленные в научной литературе данные о точности оценки суммарного содержания УВ с применением одномерной ИК-спектрометрии являются излишне оптимистическими. Реальная погрешность этого метода, даже без учета погрешностей пробоподготовки, может достигать до 80 % отн. Этот чувствительный, но неточный метод можно рекомендовать для скрининга проб, для приблизительной оценки содержания углеводов в питьевой и слабозагрязненной природной воде, а также для оценки суммарного содержания алканов. Для анализа сильнозагрязненных сточных вод лучше использовать менее чувствительный, но более устойчивый к вариациям состава пробы метод ИК-фотометрии.

2. Главный источник возникновения систематических погрешностей при ИК-спектрометрической оценке суммарного содержания УВ – различия удельных коэффициентов поглощения индивидуальных УВ (в частности, алканов и аренов) в условиях измерения обобщенного аналитического сигнала.

3. Для повышения точности оценки вместо одноволновой ИК-спектрометрии следует использовать экспрессный и простой метод ИК-фотометрии, а при наличии технических возможностей – метод многоволновой ИК-спектрометрии. Перспективен и предложенный в работе [18] способ определения суммарного содержания нефтепродуктов, основанный на измерении интегральных интенсивностей (площадей под спектральной кривой).

5.3.2. Применение многоволновых измерений

Многоволновая ИК-спектрометрия включает измерение оптической плотности раствора при нескольких (n) значениях ν . Обобщенный сигнал вычисляют по формуле $A_{\Sigma} = \sum k_i A_i$, где A_i – поглощение на i -й аналитической длине волны (АДВ), а k_i – заранее установленные весовые коэффициенты, найденные по спектру $X_{\text{ст}}$. Показатель c^* находят по одномерной градуировке $A_{\Sigma} = f(c_x)$. Известно, что при использовании многоволновой спектрометрии увеличение числа АДВ может повысить точность спектрометрического анализа многокомпонентных смесей [136], хотя при неудачном выборе АДВ этого не происходит.

Для выяснения возможностей этого метода анализировали модельные смеси индивидуальных УВ по трем методикам ($n = 1$, $n = 3$, $n = 4$). При выборе АДВ учитывали положения максимумов в спектрах УВ и их смесей, а также литературные данные. Результаты во всех случаях находили по одномерным градуировкам, построенным с помощью смеси Симарда.

Применяли следующие методики:

- Методика A , $n = 1$. Измеряли A_1 при $\nu_1 = 2930 \text{ см}^{-1}$, а затем полагали $A_{\Sigma} = A_1$.

• *Методика Б, $n = 3$.* Измеряли A_1 при $\nu_1 = 2930 \text{ см}^{-1}$, A_2 при $\nu_2 = 2960 \text{ см}^{-1}$ и A_3 при $\nu_3 = 3030 \text{ см}^{-1}$. A_Σ рассчитывали по рекомендуемой в ГОСТ 51797-2001 формуле

$$A_\Sigma = 0,19A_1 + 0,12A_2 + 1,12A_3. \quad (5.5)$$

• *Методика В, $n = 4$.* В этом случае дополнительно измеряли A_4 при $\nu_4 = 2855 \text{ см}^{-1}$. В известных методиках поглощение смесей в этой области не учитывают. A_Σ рассчитывали по формуле

$$A_\Sigma = 0,127A_1 + 0,288A_2 + 2,55A_3 + 0,134A_4. \quad (5.6)$$

Подбор регрессионных коэффициентов в формуле (5.6) был проведен методом наименьших квадратов так, чтобы нивелировать коэффициенты поглощения разных УВ и минимизировать обобщенную погрешность результата анализа [123].

С ростом n влияние случайных погрешностей усиливается, но даже при $n = 4$ они сравнительно невелики ($W < 2 \%$). Независимо от способа расчета A_Σ , градуировки $A_\Sigma = f(c_x)$ линейны ($r > 0,99$), а фоновое поглощение пренебрежимо мало. Величина C_{\min} для методики (А) составляла 0,67, для методики (Б) – 0,97 мг/дм³ и для методики (В) – 1,2 мг/дм³.

Двадцать смесей, содержащих случайным образом подобранные смеси нескольких УВ и не использовавшихся для подбора регрессионных коэффициентов в формуле (5.6), были проанализированы по всем сопоставляемым методикам. Обобщенная погрешность анализа снижалась в ряду (А) > (Б) > (В), а именно: для методики (А) $RMSEP = 23,3$, для (Б) – 10,9, для (В) – 3,8 мг/дм³. При этом среднее значение c_Σ для тест-выборки составляло 52,0 мг/дм³. Данные по пяти смесям из этой тест-выборки приведены в табл. 5.5.

Видно, что увеличение числа АДВ и применение нивелирующих регрессионных коэффициентов повышает точность оценки суммарного содержания УВ. При этом разработанная методика (В) дала лучшие результаты, чем стандартная методика Б; единичные погрешности анализа не превышали 15 %. Полностью исключить систематическую погрешность оценки c_Σ , применяя

одномерные градуировки, при $n = 4$ не удастся. Дальнейшее повышение числа АДВ не приводит к существенному снижению уровня погрешностей. Чувствительность и прецизионность методик по мере роста n несколько снижаются.

Таблица 5.5

Результаты и погрешности анализа углеводородных смесей по одномерным градуировкам с использованием разного числа АДВ

$c_{\Sigma}, \text{мг/дм}^3$	$c^*, \text{мг/дм}^3$			$\delta c, \%$		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>B</i>
58,5	$50,1 \pm 0,5$	$58,4 \pm 2,0$	$57,0 \pm 2,4$	-14	-0,20	-2,6
55,0	$92,8 \pm 0,5$	$74,1 \pm 1,4$	$60,2 \pm 2,0$	69	35	9,5
44,6	$42,5 \pm 0,4$	$50,3 \pm 1,6$	$49,5 \pm 1,8$	-4,5	13	11,0
30,2	$40,6 \pm 0,8$	$38,1 \pm 2,3$	$34,4 \pm 2,6$	34	26	13,9
51,8	$93,0 \pm 0,4$	$68,9 \pm 1,1$	$53,2 \pm 1,3$	79	33	2,6

Поскольку для большинства смесей анализ приводит к завышенным оценкам суммарного содержания УВ, причиной сохранения погрешностей может быть неоптимальный (по крайней мере для части смесей) выбор $X_{\text{ст}}$. Другой возможной причиной сохранения значимых систематических погрешностей может быть сам принцип расчета результата анализа по одномерной градуировке в пересчете на единственное стандартное вещество.

5.3.3. Измерение интегральных интенсивностей

Во многих методах анализа в качестве аналитических сигналов вместо пиковой интенсивности используют интегральную интенсивность сигнала (фактически площадь под кривой, ограниченной некоторыми значениями аргумента). В отсутствие наложений интегральная интенсивность некоторого пика прямо пропорциональна концентрации компонента. Наиболее известным примером является использование площади пиков в качестве аналитических сигналов в количественном хроматографическом анализе, однако интегральные интенсивности с успехом использовали

и в спектроскопических, и в рентгеноспектральных методах, и в ЯМР-спектроскопии. Считается, что использование интегральных интенсивностей повышает чувствительность определения и повышает точность анализа, в частности благодаря нечувствительности интегральных интенсивностей к небольшим сдвигам положения пиков, что особенно важно для оценки суммарного содержания однотипных веществ.

Применительно к ИК-спектроскопической оценке суммарного содержания однотипных веществ (углеводородов) этот прием был, по-видимому, впервые запатентован и использован группой специалистов из Тюмени [165; 166]. Метод очень похож на ИК-фотометрию, но здесь требуется регистрация спектров поглощения исследуемых образцов в двух диапазонах волновых чисел, соответствующих поглощению С-Н связей двух типов. С помощью компьютера вели численное интегрирование оптической плотности в диапазоне $3150\text{--}2994\text{ см}^{-1}$ (для определения содержания ароматических фрагментов) и $2994\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ (для определения содержания насыщенных фрагментов углеводородных молекул). Пользуясь заранее выведенными формулами, включающими усредненные коэффициенты поглощения для обеих групп аналитов, по полученным данным можно вычислить суммарное содержание всех УВ (в пересчете на выбранное стандартное вещество), кроме того, доли ароматических и алифатических фрагментов. Проверка показала, что такой метод имеет существенные преимущества по сравнению с ИК-фотометрией, поскольку позволяет довольно точно определять не только алканы и циклоалканы, но и арены, как алкилированные, так и незамещенные (бензол, нафталин). Средняя погрешность определения содержания 12 индивидуальных УВ на уровне 500 мг/л составляет $7,8\%$ отн., причем все УВ определяются с погрешностью, не превышающей 15% . Это указывает на близкие значения коэффициентов поглощения этих УВ (к сожалению в опубликованных работах они не приводятся, и вычислить параметр T невозможно).

Детальное изучение аналитических возможностей анализа реальных гидрохимических объектов с помощью интегральных интенсивностей было проведено Р.Р. Шагидуллиным [124]. Повышение точности измерений достигается, в частности, за счет многократной регистрации сигналов, процедур сглаживания спектров, разложения сложных контуров на составляющие и т. п. Используются специальные компьютерные программы для отдельного определения алифатической и ароматической составляющих. Моделируя состав экстрактов из природных вод, Р.Р. Шагидуллин использовал сильно разбавленные растворы углеводородных смесей (преимущественно на уровне 2–10 мг/л). Для построения градуировок были использованы ГСО нефтепродуктов (типа смеси Симарда), а также региональные стандартные образцы нефтей, характерных для района пробоотбора. Проанализировано свыше 100 проб разного типа, результаты сопоставлены с данными, полученными известными методами. Средняя погрешность оценки суммарного содержания УВ в природных водах по разработанной методике не превышает 10 % отн. Чувствительность методики, которую авторы называли «метод ИИИ», позволяет определять показатель «нефтепродукты» на уровне ПДК.

Таким образом, измерение интегральных интенсивностей оказалось более точным способом оценки суммарного содержания углеводородов, чем ИК-фотометрия. Разработанные методики по своей точности близки к методикам многоволновой спектрометрии. Тем не менее в практике гидрохимического анализа этот интересный метод не применяется, так как требует использования прецизионной и дорогой аппаратуры, специального программного обеспечения и наличия высококвалифицированных кадров.

5.3.4. Влияние способа расчета интегрального показателя

В ходе разработки методик определения ЕТ-антиоксидантов было установлено, что чувствительность определения аналита тем больше, чем больше электронов (n) отдает молекула антиоксиданта

в ходе реакции. При использовании одноэлектронных окислителей типа Fe^{3+} , Cu^{2+} или DPPH* окисление одной молекулы антиоксиданта приводит к образованию n молекул продукта реакции. Так как в природных смесях присутствуют антиоксиданты разного строения, у которых величина n различна [167], это обстоятельство усиливает разброс градуировок (см. раздел 3.1). Однако можно выражать суммарное содержание ЕТ-антиоксидантов в реальных объектах в пересчете на моль-эквиваленты стандартного вещества. Тогда результатом анализа будет не молярная, а «нормальная» концентрация суммы антиоксидантов. В других методах анализа такой прием применяют довольно давно. По результатам титрования смесей кислот разной основности стандартным раствором щелочи можно определить суммарное содержание кислот в моль-экв/л, но нельзя точно определить содержание кислот в моль/л или в г/л. Та же закономерность характеризует кулонометрическое определение суммы однотипных веществ. В ряде работ по определению антиоксидантов их авторы рекомендуют выражать содержание АО, используя так называемые тролокс-эквиваленты (единицы ТЕАС) [14], независимо от способа измерения АОА. Но в соответствующих публикациях не указывалось, что применение нормальных концентраций тролокса для оценки АОА уменьшает отличие этого показателя от действительного суммарного содержания антиоксидантов (при выражении обеих величин в моль-экв/л), т. е. уменьшает погрешность метода. В работе [73] сопоставляли вееры градуировок, полученные для выборки антиоксидантов (рис. 5.6) с применением разных способов выражения концентраций.

Видно, что в результате перехода к нормальным концентрациям, вычисленным для каждого АО с учетом числа отдаваемых им электронов, коэффициенты чувствительности индивидуальных АО сближаются, параметр T уменьшается с 4 до 2 единиц. Следовательно, переход к нормальным концентрациям должен приводить к более точной оценке содержания антиоксидантов. Это было подтверждено в ходе анализа модельных смесей (табл. 5.6).

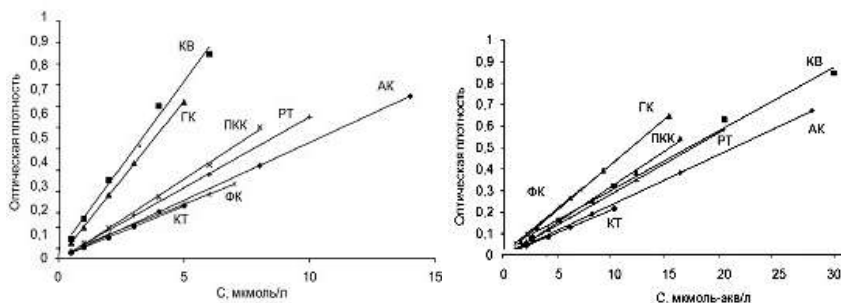


Рис. 5.6. Веер градуировочных графиков при разных способах выражения концентраций антиоксидантов: слева – в мкмоль/л; справа – в мкмоль-экв/л

Таблица 5.6

Результаты определения суммарного содержания антиоксидантов в пересчете на аскорбиновую кислоту при разных способах выражения суммарной концентрации

Компоненты смеси	c_b мкМ	c_{Σ}		АОА (c^*)		$\delta C, \%$	
		мкМ	мкМ-экв	мкМ	мкМ-экв	мкМ	мкМ-экв
АК КВ	3,0 1,0	4,0	11,0	$5,6 \pm 0,2$	$12,5 \pm 0,5$	40	14
АК РТ	1,0 3,0	4,0	8,0	$4,6 \pm 0,1$	$9,4 \pm 0,3$	15	17
АК ГК	2,0 2,0	4,0	10,0	$7,2 \pm 0,3$	$14,4 \pm 0,6$	80	44
КВ ФК	0,5 3,5	4,0	9,5	$4,6 \pm 0,3$	$9,3 \pm 0,7$	15	-2
КТ ПКК	2,0 2,0	4,0	8,0	$4,6 \pm 0,5$	$9,3 \pm 0,9$	15	16
АК КТ ПКК	1,5 1,5 1,0	4,0	8,0	$5,6 \pm 0,2$	$10,9 \pm 0,9$	40	36

Примечание. Система Fe – PHEN, $\tau = 60$ мин.

Как правило, абсолютная величина погрешностей после перехода к нормальным концентрациям снижается в 1,5–2 раза. Однако такой переход не приводит к абсолютной тождественности градуировочных графиков и полному исключению систематических погрешностей при оценке суммарного содержания антиоксидантов. Это может быть связано с изменением числа электронов, которое отдает молекула антиоксиданта. Величина n , найденная, например, электрохимическими методами, может отличаться от величины n в условиях его определения по методу FRAP. Есть и другой, более важный фактор. После исключения влияния стехиометрического фактора сохраняются различия в скорости взаимодействия разных антиоксидантов с окислителем. Можно предположить, что повышение температуры или времени экспозиции, а также изменения концентраций реагентов снизят влияние кинетических факторов и еще более приблизят показатель АОА к действительному содержанию антиоксидантов.

Несколько иная ситуация характеризует рефрактометрическое определение суммы углеводов. Если концентрацию водных растворов индивидуальных углеводов выражать в г/л, то различия в чувствительности определения разных углеводов оказываются статистически незначимы (уровень значимости нуль-гипотезы выше 0,05). На чувствительность рефрактометрического определения индивидуальных углеводов не влияет структура соответствующих молекул (число атомов в цикле, наличие альдегидной или кетонной группы и т. п.). Моно- и дисахариды определяются с приблизительно одинаковой чувствительностью ($T = 1,2$). Это отличает рефрактометрию от более селективных методов определения углеводов, основанных на проведении фотометрических реакций (методы Бертрана, Шомоди–Нельсона, Лурье и др.). Именно поэтому рефрактометрию с успехом используют для оценки суммарного содержания водорастворимых углеводов (моно- и дисахаридов) в пересчете на сахарозу или глюкозу [168].

Если же выражать концентрацию углеводов в моль/л, то градуировочные графики для разных углеводов образуют широ-

кий веер. Чувствительность определения разных углеводов достоверно различается ($T = 2,8$); при этом значения K_i для дисахаридов оказываются вдвое выше, чем для моносахаридов. В этом случае суммарное содержание разных углеводов в смеси моно- и дисахаридов должно оцениваться весьма неточно, относительная величина систематической погрешности ($\delta c, \%$) может достигать до 180 % [115].

Очевидно, для правильной оценки суммарного содержания однотипных веществ недостаточно выбрать оптимальный способ измерения обобщенного аналитического сигнала, надо правильно выбрать способ расчета ИП. В частности, следует выражать содержание однотипных веществ в тех единицах измерения концентраций, применение которых не приведет к расширению веера градуировок.

5.4. Выбор стандартного вещества

5.4.1. Требования к стандартным веществам

Известно, что точность оценки суммарного содержания однотипных веществ, выраженного в пересчете на некоторое стандартное вещество $X_{ст}$, сильно зависит от выбора $X_{ст}$. Следовательно, надо правильно выбрать это вещество. Внутригрупповая селективность сигналов от выбора стандарта не изменится, но неверный выбор приведет к ошибочным оценкам суммарного содержания однотипных веществ – сильно заниженным или, наоборот, сильно завышенным – даже при низкой селективности сигналов. Поэтому неоднократно обсуждалось, какие $X_{ст}$ лучше использовать при определении того или иного ИП, например при определении суммарного содержания белков [5] или при оценке суммарного содержания антиоксидантов [169]. В общем виде проблема не рассматривалась.

Перечислим сначала *практические требования* ко всем стандартным веществам (далее – «стандартам»). Очевидно, стандарты должны быть индивидуальными соединениями с точно из-

вестным составом и структурой или их смесями с известным соотношением компонентов. **Стандарты должны быть коммерчески доступны, относительно дешевы, устойчивы при хранении, не токсичны и хорошо растворимы.** Последнее требование актуально, если градуировочная зависимость строится по растворам стандарта, как это обычно и бывает. В случае массового применения некоторого стандартного вещества желательно (но не обязательно), чтобы оно имело статус ГСО. Примером являются ГСО нефтепродуктов для лабораторий природоохранного профиля. ГСО 8824-2006 представляет собой ампулу с раствором трехкомпонентной смеси Симарда в CCl_4 , причем суммарная массовая концентрация УВ в этом растворе точно известна. ГСО 7117-94 – это водорастворимые таблетки с известной массой некоторого технического нефтепродукта. Указанные стандарты ориентированы на ИК-спектрометрический метод оценки содержания нефтепродуктов. Существуют и «двойные» стандарты, которые могут быть использованы для построения градуировок разного типа, например ИК-спектрометрических и флуориметрических [119; 170].

Общим требованиям к стандартам соответствует слишком много веществ. Нужно сформулировать специфические требования к стандартам, используемым для расчета ИП определенного типа (см. раздел 2.3). Стандарты, используемые для расчета интегральных показателей 1-го и 2-го типа, должны относиться к той же группе веществ, что и соответствующие аналиты. Примером могут быть галловая кислота или тролокс при оценке суммарного содержания антиоксидантов; сахароза при оценке суммарного содержания моно- и дисахаридов; смесь Симарда при оценке суммарного содержания углеводов. Совершенно другие требования должны предъявляться к стандартам для определения ИП 3-го типа (ХПК, кислотное число и т. п.). В этом случае в качестве стандартов используют реагенты на вещества искомой группы, а не компоненты группы. Требования к таким стандартам, а также к стандартам для определения ИП 4-го типа далее не рассматриваются, ибо нельзя объять необъятное. Рассмотрим специфические

требования к наиболее важным стандартам. Для ИП 1-й и 2-й групп можно сформулировать четыре основные требования:

1. Состав, структура и свойства стандарта должны приблизительно соответствовать веществам, суммарное содержание которых оценивается. В частности, в условиях определения ИП стандарт должен создавать сигнал того же типа, что и аналиты. Так, суммарное содержание алканов можно оценить ИК-спектрометрическим методом в пересчете на изооктан, поскольку и изооктан, и другие алканы поглощают ИК-излучение в области 3,42 мкм. Использовать в качестве стандарта УВ других типов (скажем, нафталин) не следует: нафталин не принадлежит к алканам и не поглощает ИК-излучение при 3,42 мкм.

2. Чувствительность определения стандарта должна соответствовать условию

$$K_1 < K_{\text{ст}} < K_m, \quad (5.7)$$

где K_1 и K_m – минимальное и максимальное значения из выборки коэффициентов чувствительности, характеризующей вещества искомой группы. Именно всей группы, а не единичной пробы, поскольку качественный состав смеси веществ, присутствующих в единичной пробе, обычно неизвестен. Так, *n*-гексан можно использовать в качестве стандарта при ИК-фотометрическом определении алканов, поскольку коэффициенты удельного поглощения алканов при использовании концентратомера ИКН-025 находятся в интервале 2,2–2,8 л/г·см (см. подраздел 3.1.3), а коэффициент удельного поглощения *n*-гексана в этих условиях – 2,5 л/г·см.

Критерием выбора стандарта иногда считают сходство спектра поглощения $X_{\text{ст}}$ и спектров анализируемых проб. В целом это правильно, хотя точное совпадение необязательно. Но если, сопоставляя спектры, учитывать только положения максимумов и форму спектральных кривых и не учитывать коэффициенты поглощения [170], возможны грубые ошибки.

Математические выкладки, приведенные в разделе 3.3, показывают, что при выполнении условия (5.7) и прочих равных условиях систематическая погрешность оценки c_{Σ} тем меньше, чем

больше доля $X_{\text{ст}}$ в исследуемой смеси [114]. Использовать в качестве стандарта именно основной компонент пробы не обязательно, однако это полезно и соответствует традициям. Так, при определении фенольного индекса сточных вод в качестве $X_{\text{ст}}$ всегда используют простейший фенол, поскольку он является основным компонентом многих техногенных смесей.

При выборе стандарта по чувствительности определения разных компонентов искомой группы возникают трудности. Не всегда известно, какие именно соединения входят в данную группу, с какой чувствительностью они определяются по выбранной методике. Очевидно, состав и свойства группы однотипных веществ должны быть изучены до разработки методики оценки их суммарного содержания, а не наоборот. Об этом уже говорилось в разделе 1.1.

3. Рекомендуется использовать в качестве $X_{\text{ст}}$ вещество, определяемое по выбранной методике со средней чувствительностью

$$K_{\text{ст}} = 0,5 (K_1 + K_m), \quad (5.8)$$

где K_1 и K_m – коэффициенты чувствительности для аналитов данного типа, определяемых с минимальной и максимальной чувствительностью. Этот подход возможен в том случае, когда качественный состав проб неизвестен, а известны только коэффициенты чувствительности всех аналитов данного типа [114]. Выполнение условия (5.8) минимизирует предельную величину систематических погрешностей, вызванных внутригрупповой селективностью сигналов (см. раздел 3.3). Использование *n*-гексана как стандартного вещества при ИК-фотометрическом определении алканов (см. выше) отвечает формуле (5.8) и должно привести к более точным оценкам их суммарного содержания, чем применение других веществ.

4. Если выбранный стандарт представляет собой смесь веществ, входящих в искомую группу, желательно, чтобы их соотношение отвечало ожидаемому соотношению тех же компонентов в анализируемых пробах. Так, состав смеси Симарда [99] в какой-то степени моделирует групповой состав смесей угле-

водородов, присутствующих в природных и сточных водах [12]. Тот же принцип определяет и выбор калибраторов при определении «общего белка» в биологических жидкостях. Поскольку соотношение альбуминов и глобулинов в моче здорового человека приблизительно равно 7:3, то рекомендуется использовать стандарты (калибраторы) именно с таким соотношением А/Г [5]. От этого правила отходят только в том случае, когда используемая методика измерений имеет высокую внутригрупповую селективность. Так, при определении «общего белка» методом ССК, мало-чувствительным к глобулинам, рекомендуется применять альбуминовый калибратор [86; 100].

Если известны и ожидаемый состав проб, и коэффициенты чувствительности при определении основных компонентов пробы, сформулированный выше принцип трансформируется в конкретную рекомендацию [36], а именно: **правильная оценка ($c^* = c_\Sigma$) суммарного содержания аналитов достигается, если в качестве стандарта применить вещество (смесь, калибратор), отвечающее условию (3.11):**

$$K_{\text{ст}} \approx \sum K_i R_i,$$

где R_i – нормированные значения концентраций основных компонентов пробы, относящихся к искомой группе. Если ожидаемые концентрации таких компонентов примерно одинаковы, в качестве стандарта рекомендуется использовать вещество, для которого

$$K_{\text{ст}} = \frac{\sum K_i}{n} = \overline{K_i}. \quad (5.10)$$

Эти рекомендации получены в рамках модели, описанной в разделе 3.2. В частности, предполагается, что основной вклад в погрешность оценки суммарных содержаний вносит внутригрупповая селективность, а обобщенные аналитические сигналы аддитивны. Заметим, что в вышеприведенных формулах суммируются характеристики основных компонентов анализируемых проб, относящихся к искомой группе аналитов, а не всех веществ данной группы.

В отдельных случаях для подбора наиболее подходящего стандартного вещества используют еще один прием. А именно, сопоставляют коэффициенты чувствительности предполагаемых стандартов с коэффициентами чувствительности определения смесей аналитов, выделенных из исследуемых проб. Примером может быть рис. 5.7, взятый из статьи [12]. Он подтверждает правильность выбора смеси Симарда в качестве стандарта для определения нефтепродуктов методом одноволновой ИК-спектрометрии. Наклон соответствующего градуировочного графика приблизительно совпадает с наклонами градуировок, построенных с помощью растворов разных нефтей и нефтепродуктов. Градуировка, построенная с помощью смеси Симарда, находится внутри соответствующего веера градуировок.

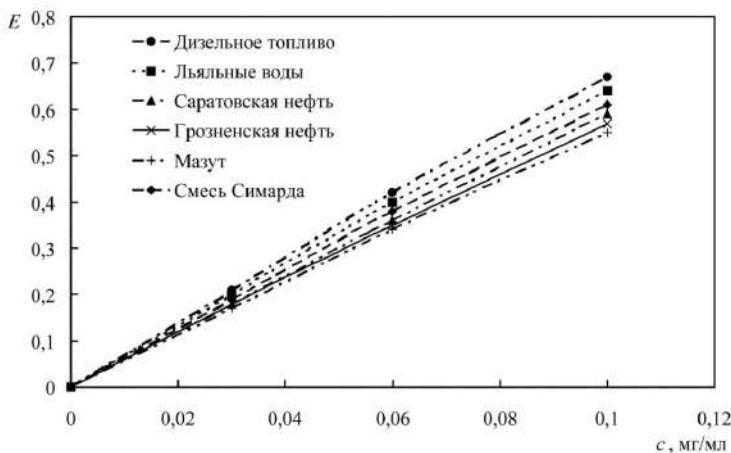


Рис. 5.7. Зависимость поглощения в ИК-области спектра (2930 см^{-1}) от суммарной концентрации углеводородов, присутствующих в различных нефтепродуктах и в смеси Симарда

Аналогичным образом можно проверить правильность подбора калибратора для определения общего белка. К сожалению, изложенный методический прием применим далеко не всегда;

в ряде случаев выделить из исследуемых проб искомую группу аналитов и приготовить рабочие растворы с точно известной концентрацией аналитов не удастся, в частности этого нельзя сделать при определении антиоксидантной активности.

5.4.2. Подбор стандартов при определении некоторых групп веществ

Углеводороды. Независимо от способа измерения аналитического сигнала суммарное содержание УВ в гидрохимических объектах обычно оценивают в пересчете на стандартную трехкомпонентную смесь бензола (25 %), гексадекана (37,5 %) и изооктана (37,5 %), которую не совсем правильно называют смесью Симарда. Р. Симард рекомендовал использовать те же УВ, но при несколько другом их соотношении [99]. Правильность выбора для одноволновой ИК-спектрометрии подтверждена многими исследователями и многолетней практикой гидрохимического анализа. Однако правомерность использования смеси Симарда в качестве стандарта для метода ИК-фотометрии требует дополнительной проверки.

Использовать в качестве $X_{\text{ст}}$ индивидуальные УВ в рамках ИК-фотометрии не удастся. Применение любых аренов (даже алкилированных) приводит к сильно завышенным, а применение алканов или циклоалканов – к сильно заниженным результатам анализа. В качестве стандарта можно использовать только смеси УВ. Сопоставление состава и свойств смеси Симарда с приведенным выше набором требований показывает, что в случае ИК-фотометрии смесь Симарда соответствует требованиям 1 и 2, а требования 3 и 4 выполняются не в полной мере. Удельные коэффициенты поглощения УВ, измеренные с помощью ИКН-025, соответствуют интервалу от $K_1 = 0$ (бензол) до $K_m = 2,8 \text{ л/г} \cdot \text{дм}^3$ (высшие алканы). Оптимальное значение $K_{\text{ст}}$, вычисленное по формуле (5.10), должно быть около $1,4 \text{ л/г} \cdot \text{дм}^3$ (см. раздел 3.1). Значение $K_{\text{ст}}$ для смеси Симарда – около $2,0 \text{ л/г} \cdot \text{дм}^3$. Доля бензола в смеси Симарда (25 %) также не совпадает с долей аренов в нефтепродуктах, вы-

деленных из природных вод. По литературным данным, доля аренов составляет обычно 30–40 % и растет по мере деградации нефтепродуктов. Применение смеси Симарда для проб с высоким содержанием аренов должно вести к заниженным результатам. Это подтвердилось в эксперименте (табл. 5.7).

Таблица 5.7

**Погрешности (δ с, %) ИК-фотометрической оценки
суммарного содержания УВ в модельных смесях
при использовании разных стандартов**

Состав смеси	Соотношение компонентов	Стандарты				
		толуол	п-ксилол	изооктан – толуол 1:1	смесь Симарда	н-гексан
н-Гексан, изооктан	3:1	667	374	83	2,4	–12
	1:1	667	374	81	2,7	–12
	1:3	636	355	83	–2,0	–16
н-Гексан, толуол	1:1	409	214	22	–39	–47
	1:2	320	160	0	–53	–62
	1:3	246	114	–17	–61	–70

Как видно из табл. 5.7, применение смеси Симарда дает хорошие результаты, если в составе исследуемых проб доминируют алифатические соединения (алканы и циклоалканы). Для анализа таких проб настраивать концентратомеры действительно следует с помощью смеси Симарда, как рекомендуют изготовители приборов. Однако для проб с высоким содержанием аренов (нижняя часть таблицы) оценки содержания УВ в пересчете на смесь Симарда оказываются заниженными, иногда на 50–60 %. Расчеты показывают, что для ИК-фотометрического анализа смесей с высоким содержанием аренов в качестве $X_{ст}$ лучше использовать стандарты, имеющие меньший удельный коэффициент поглощения, чем смесь Симарда. Мы рекомендуем в таких случаях использовать смесь изооктана и толуола (1:1). Однако ее применение для оценки содержания УВ в пробах, не содержащих арены, приведет к существенно завышенным результатам анализа.

Подобрать стандартное вещество, которое было бы в равной степени пригодно для оценки суммарного содержания любых углеводородов, в рамках метода ИК-фотометрии нельзя, внутригрупповая селективность аналитических сигналов слишком велика. Задача может быть решена методом ИИИ (два стандарта!), а еще лучше – с применением многомерных градуировок, поскольку в этом методе одновременно используют множество стандартов разного состава [50; 151].

Фенолы. При оценке суммарного содержания фенолов в качестве стандарта всегда использую простейший фенол C_6H_5OH . Однако при спектрометрическом определении суммы фенолов с применением 4-аминоантипирина этот выбор не оптимален, независимо от состава пробы. На указанной в стандартных методиках длине волны (490 нм) хинониминный краситель, полученный из C_6H_5OH , поглощает свет намного лучше, чем такие же производные других фенолов. Условие (5.8) не выполняется. Результаты анализа, выраженные в пересчете на фенол, оказываются сильно заниженными по сравнению с действительным содержанием фенолов, а также результатами применения других методов (табл. 5.8).

Таблица 5.8

Результаты оценки суммарного содержания фенолов (мкг/дм³) в сточных водах при разных способах оценки (по данным [26])

<i>Источник фенольного загрязнения</i>	<i>ВЭЖХ</i>	<i>ФИ</i>
Нефтехимическое производство	139	73
Предприятие хлорорганического синтеза	90,9	38
Предприятие текстильной промышленности	30,8	4
Производство пестицидов	82,1	6

Переходить к применению другого стандарта, сохраняя 4-аминоантипирин в качестве реагента, нецелесообразно. Методики определения фенольного индекса имеют ряд других недостатков, прежде всего, высокую внутригрупповую селективность. Предложенная нами методика [66] не только менее селективна, но

и соответствует вышеперечисленным требованиям, определяющим выбор стандарта. Ее недостатком является лишь меньшая чувствительность определения фенолов, чем при использовании стандартных методик. Интересно, что фенол, используемый в [66] в качестве стандарта, после превращения в азокраситель имеет удельный коэффициент поглощения, отвечающий формуле (5.8). Как видно из табл. 5.3, суммарное содержание фенолов определяется по методике [66] приблизительно правильно, преобладания завышенных или заниженных результатов нет.

Антиоксиданты. Проблема выбора стандартного вещества при оценке АОА стоит особенно остро, потому что в этой области используется множество несходных между собой методик. Нет здесь и общепринятых стандартов. В рамках одного и того же метода разные исследователи применяют разные стандарты. Так, определяя АОА FRAP, в качестве стандартов используют тролокс, железо(II), аскорбиновую кислоту, кофейную кислоту, галловую кислоту, рутин, кверцетин и другие вещества. Изобилие методик и стандартных веществ затрудняет сопоставление данных, полученных разными исследователями. Несколько помогает возможность пересчета найденной величины АОА на другой стандарт по эмпирическим уравнениям соответствия [171], но проблему совместимости результатов это не решает – уравнения соответствия должны быть получены в строго одинаковых условиях.

Применить формулу (5.9) для подбора стандартного вещества в данном случае не удастся: состав объектов слишком сложен и недостаточно изучен. Кроме того, сигналы антиоксидантов нередко являются неаддитивными, а формула (5.9) в этих случаях неприменима. Специалисты неоднократно отмечали недостатки разных стандартов и пришли к заключению, что выбрать «универсальный стандарт» для оценки АОА в целом, безотносительно к способу формирования и измерения сигналов, невозможно [169]. В лучшем случае можно договориться о выборе единых стандартов применительно к каждому методу, каждому ИП. Например, тролокс давно играет роль единого стандарта для метода TEAC,

а аскорбиновую кислоту принято использовать при определении АОА пищевых продуктов по методу FRAP. Отметим, что в последнем случае условие (5.8) приблизительно выполняется.

В заключение отметим, что оптимальный выбор стандарта не решает проблему точной оценки суммарного содержания однотипных веществ. Это – лишь вспомогательное средство. Главным является снижение внутригрупповой селективности. При одинаковой чувствительности определения однотипных веществ выбор стандарта вообще не имеет значения, результат расчета при любом $X_{ст}$ будет одним и тем же. Как будет показано в разделе 6.3, не зависят от выбора стандарта и интервальные оценки суммарных содержаний.

5.5. Методики и результаты анализа реальных объектов

Применение описанных в разделах 5.1–5.4. методических приемов позволило разработать ряд новых или существенно модифицированных методик выполнения измерений (МВИ), которые позволяют надежно определить суммарное содержание (массовую долю) однотипных веществ в реальных объектах. Эти методики включают построение одномерных градуировок и вычисление интегральных показателей, выраженных в пересчете на выбранное стандартное вещество. Методики аттестованы и запатентованы, или внесены в Федеральный реестр методик выполнения измерений. Далее в качестве примеров будут приведены три такие методики, используемые для определения фенолов в природных и сточных водах (подраздел 5.5.1), углеводов в природных и сточных водах (подраздел 5.5.2) и антиоксидантах в пищевых продуктах (подраздел 5.5.3). Приведены также некоторые результаты анализа соответствующих объектов. Более сложные методики определения суммарного содержания однотипных веществ, не связанные с пересчетом сигналов на содержание стандарта и основанные на применении многомерных градуировок, будут описаны в разделах 6.1 и 6.2.

5.5.1. Способ определения суммарного содержания фенолов [66]⁷

В ОмГУ был разработан и запатентован способ определения суммарного содержания фенолов в природных и сточных водах. Новый способ, как и ряд известных, основан на введении в анализируемую пробу реагентов, переводящих фенолы в окрашенные соединения, измерении оптической плотности пробы при определенной АДВ и вычислении суммарного содержания фенолов по предварительно построенному градуировочному графику, в пересчете на простейший фенол. Известные способы имеют низкую точность. Так, способ определения фенолов с 4-аминоантипирином [23] приводит к заниженной величине фенольного индекса, иногда отличающейся от действительного содержания фенолов в несколько раз [25; 26]. Точность анализа повышается при замене 4-аминоантипирина реагентами, переводящими фенолы в соответствующие азокрасители, в частности при использовании диазотированной сульфаниловой кислоты.

Обычно реакцию с ДСК проводят в слабощелочной среде, а оптическую плотность измеряют в видимой области [24; 156]. Точность данного способа определения фенолов недостаточна, погрешности составляют 50 % и более. Для повышения точности предложено проводить реакцию с ДСК при pH 7,2 ÷ 8,5, использовать фиксированное время экспозиции в пределах от 10 до 30 мин, а оптическую плотность полученного раствора измерять в УФ-области при 340 ÷ 370 нм (рис. 5.8).

В оптимизированных условиях аналитические сигналы разных фенолов различаются всего в 1,5–2 раза (при прочих одинаковых условиях). Причины ухудшения точности результатов анализа при выходе варьируемых параметров за указанные пределы рассмотрены в разделе 5.2. Переход к измерениям в УФ-области не ухудшает прецизионность результатов анализа и лишь незначительно повышает предел обнаружения фенолов.

⁷ Подраздел подготовлен при участии Т.В. Антоновой.

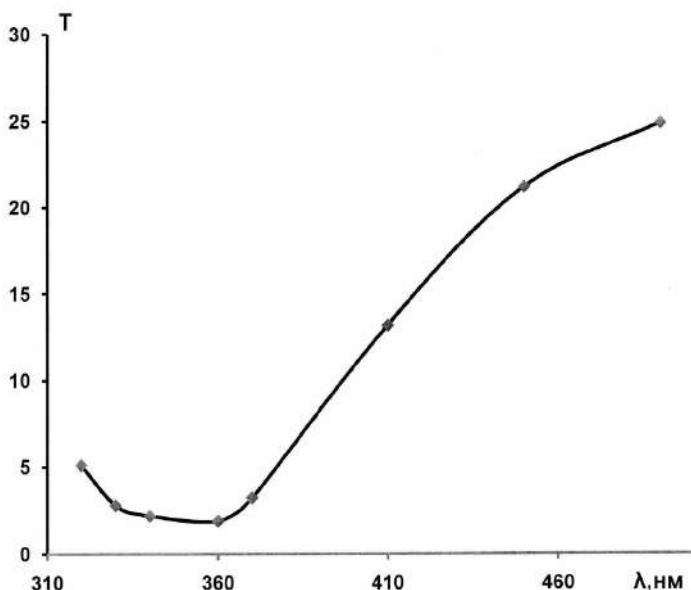


Рис. 5.8. Влияние выбора длины волны на внутригрупповую селективность сигналов при определении суммарного содержания фенолов по реакции с ДСК. Значения T определены для выборки, включающей шесть разных фенолов

В оптимизированных условиях относительная погрешность определения суммарного содержания фенолов не превосходит 25 % отн. (см. табл. 5.3). Методики анализа вод разного типа различаются. Экспрессная методика 1 пригодна для анализа слабозагрязненных природных вод в отсутствие мешающих веществ. Методика 2, включающая отгонку летучих фенолов, предназначена для анализа любых природных вод, а также сточных вод химических и нефтехимических предприятий. Проверка на сточных водах ОАО «Газпромнефть – Омск» показала, что анализ без отгонки фенолов приводит к сильно завышенным результатам.

Пример 5.1. Определение суммарного содержания фенолов в слабо загрязненных водах без отгонки. В три мерные колбы на 50 см³ помещают по 40 см³ исследуемой воды и по 5 см³ 0,05 М раствора бикарбоната натрия. Добавляют 1 см³ раствора ДСК с концентрацией $5,0 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Колбы закрывают крышками и через 10 мин измеряют оптическую плотность каждого раствора на длине волны 360 нм в кюветах с толщиной слоя 20 мм. В качестве раствора сравнения выступает холостой раствор, содержащий все компоненты, кроме пробы. По среднему значению оптической плотности находят суммарную концентрацию фенолов в растворе C_2 (мкМ) по предварительно построенному градуировочному графику. Суммарное содержание фенолов в воде (в мкг/дм³) в пересчете на простейший фенол вычисляют с учетом разбавления в ходе пробоподготовки. Продолжительность анализа единичной пробы без учета пробоподготовки не превышает 1 ч.

Построение градуировочного графика. В мерные колбы вместимостью 50 см³ вводят переменный объем V раствора фенола концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ ($V = 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0$ см³), 5 см³ 0,05 М раствора бикарбоната натрия для создания pH = 7,3 и дистиллированную воду до 2/3 объема колбы. Добавляют 1,0 см³ раствора ДСК концентрации $5,0 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Измерение оптической плотности приготовленных растворов проводят через 10 мин в кюветах с толщиной слоя раствора 20 мм на длине волны 360 нм относительно холостого раствора. Холостой раствор содержит все те же компоненты, что и исследуемый, кроме фенола. По найденным величинам оптической плотности строят градуировочный график в координатах «оптическая плотность A – концентрация фенолов C , мкМ». Для повышения чувствительности анализа проводят дополнительные операции (экстракционное извлечение суммы окрашенных соединений).

Пример 5.2. Определение суммарного содержания летучих фенолов в сточных и сильно загрязненных природных водах (с предварительной отгонкой). Мерным цилиндром вместимостью 500 см³ отбирают 500 см³ анализируемой пробы и помещают в круглодонную колбу на 1000 см³. Добавляют 5 см³ 10%-го раствора

сульфата меди(II) и 10 см³ 10%-го раствора серной кислоты. Собирают установку для отгонки фенолов с водяным паром при атмосферном давлении. Отгонка производится, как в стандартных методиках определения фенолов в сточных водах [172]. После того как объем отгона составит примерно 460 мл, перегонку прекращают. Полученный отгон анализируют в соответствии с методикой, описанной в примере 5.1. Результат рассчитывают по формуле

$$C_{\text{фенолов}} = 0,235 \cdot C_2 \cdot V_{\text{отгона}},$$

где C_2 – концентрация фенолов, найденная по градуировочному графику, мкМ; $V_{\text{отгона}}$ – объем отгона, см³; 0,235 – коэффициент пересчета, учитывающий объем пробы, разбавление и молярную массу стандартного вещества.

По сравнению с прототипом предлагаемый способ существенно повышает точность фотометрического определения суммарного содержания фенолов в пересчете на простейший фенол. Для повышения чувствительности анализа можно проводить дополнительные операции (экстракционное извлечение суммы окрашенных соединений).

Проверка методик. Разработанные методики проверяли, сопоставляя результаты анализа некоторых сточных и природных вод по разработанным методикам с результатами применения референтных методик, предполагающих полное разделение индивидуальных фенолов и суммирование найденных концентраций. В основном использовали стандартную методику [173]. Анализ выполняли методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы Shimadzu (Япония), состоящем из электрохимического детектора Procede (материал электрода ячейки – стеклоуглерод с соляным мостиком); колонки аналитической Phenomenex Luna C18 (150×2,0 мм, размер частиц 5 мкм); температура колонки 35 °С. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и ацетатного буфера (рН = 5), элюировали фенолы в изократическом режиме с расходом подвижной фазы 0,35 мл/мин. Суммарное содержание фенолов находили как сумму найденных концентраций всех опознанных фенолов.

Для сравнения в тех же пробах оценивали содержание фенолов по стандартной методике [172]. В этом случае массовую концентрацию летучих с паром фенолов в пересчете на простейший фенол (фенольный индекс) определяли после отгонки фенолов из подкисленной пробы воды, экстрагируя хлороформом продукты взаимодействия летучих фенолов с 4-аминоантипирином в присутствии гексацианоферрата калия в щелочной среде ($\text{pH} = 10$). Затем измеряли оптическую плотность экстракта в видимой области спектра и находили массовую концентрацию фенолов в пересчете на $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$. Результаты сопоставительного анализа некоторых проб приведены в табл. 5.9 и 5.10. Во всех случаях результаты получены по методикам, включающим отгонку летучих фенолов.

Расхождения результатов, полученных по разработанной (ДСК) и референтной (ВЭЖХ) методикам, для вод, сильно загрязненных фенолами, оказались незначимыми. Это подтверждает возможность применения новой методики в лабораториях природоохранного профиля. Суммарное содержание фенолов, найденное по методике ДСК в природных водах, приблизительно совпало с величиной ФИ, найденной по стандартной методике в аккредитованной лаборатории. Для сточных вод значения ФИ оказались достоверно ниже, чем суммарные содержания фенолов, найденные по методикам ДСК или ВЭЖХ, однако различия были меньшими, чем в случае анализа модельных смесей разных фенолов. Дело в том, что при загрязнении водоемов сточными водами нефтеперерабатывающих предприятий и коммунальными стоками в фенольных смесях преобладает простейший фенол (в отличие от сточных вод многих других предприятий). В подобных случаях стандартная методика определения ФИ дает приблизительно правильную оценку фенольного загрязнения водоемов. Учитывая, что омский регион является крупнейшим центром нефтепереработки и нефтехимии, а исследованные пробы были взяты именно в этом регионе, ниже водосбросов соответствующих предприятий большие различия результатов анализа этих проб по методикам ДСК и ФИ не наблюдались.

Для дополнительной проверки новых методик использовали способ стандартных добавок. Использовали добавки разных фенолов (по отдельности или в смеси). Найденные добавки определялись с погрешностями, по модулю не превышающими 25 % отн.

Таблица 5.9

Определение суммарного содержания фенолов в сильнозагрязненных (пробы 1, 2) и слабозагрязненных (пробы 3, 4) природных водах

<i>Характеристики проб</i>			<i>Суммарное содержание фенолов, мкг/дм³</i>		
<i>№</i>	<i>Дата отбора</i>	<i>Место отбора</i>	<i>ДСК</i>	<i>ФИ</i>	<i>ВЭЖХ</i>
1	28.05.13	р. Омь, д. Ростовка	$1,5 \pm 0,4$	1,3	1,6
2	29.05.13	р. Омь, г. Омск	$1,7 \pm 0,4$	1,4	1,8
3	24.05.13	р. Иртыш, п. Береговой	$0,13 \pm 0,06$	$0,09 \pm 0,05$	Не определяли
4	24.05.13	р. Иртыш, с. Новотроицкое	$0,15 \pm 0,08$	$0,08 \pm 0,03$	Не определяли

Таблица 5.10

Результаты определения суммарного содержания летучих фенолов в сточных водах, полученные с применением разных методик

<i>№</i>	<i>Характеристики проб</i>	<i>Содержание фенолов, мкг/дм³</i>		
		<i>ДСК</i>	<i>ФИ</i>	<i>ВЭЖХ</i>
5	Нефтеперерабатывающее производство 1 (вход на очистку)	$4,0 \cdot 10^3$	$3,04 \cdot 10^3$	$4,05 \cdot 10^3$
6	Нефтеперерабатывающее производство 2 (очищенные стоки)	5	3	3
7	Пищевое производство	60	38	55
8	Коммунальные стоки	4	3	3
9	Ливневые стоки предприятия	3	2	3

5.5.2. ИК-спектрометрический способ определения суммарного содержания нефтепродуктов в сточных и сильно загрязненных природных водах [101]⁸

В ОмГУ разработан новый способ ИК-спектрометрического определения суммарного содержания углеводов в сточных и сильно загрязненных природных водах. Результаты проверки и применения данной методики в ходе анализа гидрохимических объектов показали, что она имеет существенные преимущества по сравнению с известными, и была оформлена соответствующая заявка на изобретение.

Известны способы ИК-спектрометрического определения суммарного содержания УВ в водах в пересчете на стандартное вещество, основанные на измерении оптической плотности экстракта при нескольких значениях волнового числа, приблизительно соответствующих основным максимумам в ИК-спектрах поглощения индивидуальных УВ (алканов, циклоалканов и аренов). Обычно оптическую плотность измеряют при трех заранее выбранных значениях волновых чисел. По результатам этих измерений вычисляют обобщенный аналитический сигнал (A_{Σ}) углеводов, присутствующих в пробе, используя заранее заданные весовые коэффициенты (k_i), которые находят по спектру поглощения выбранного стандарта:

$$A_{\Sigma} = \sum k_i A_i . \quad (5.9)$$

С помощью растворов $X_{\text{ст}}$ строят одномерную градуировочную зависимость вида

$$A_{\Sigma} = K_{\text{ст}} C_X . \quad (5.10)$$

При построении градуировки значения A_i измеряют при тех же значениях волновых чисел и вычисляют A_{Σ} по той же расчетной формуле. Интегральный показатель (углеводородный индекс), приблизительно равный суммарному содержанию УВ, рассчиты-

⁸ Подраздел подготовлен при участии С.В. Усовой.

вают с помощью построенной градуировки, учитывая разбавление пробы в ходе пробоподготовки. Соответствующие способы широко применяются в практике гидрохимического анализа, особенно в странах Евросоюза. Способ, изложенный в российском ГОСТ 51797-2001 [21], применяют для определения суммарного содержания эмульгированных и растворенных УВ (алканов, циклоалканов и аренов) в питьевой воде и воде источников хозяйственно-питьевого водоснабжения. Содержание УВ в исследуемых водах должно находиться в диапазоне 0,05–50 мг/дм³. Обобщенный сигнал УВ рассчитывают по формуле

$$A_{\Sigma} = 0,19A_1 + 0,12A_2 + 1,12A_3. \quad (5.11)$$

Недостатком этого способа является низкая точность определения суммарного содержания УВ. Как указано в [8], предельная относительная погрешность оценки содержания УВ составляет 25 % при высоком и 50 % при низком содержании УВ в исследуемой воде. Проведенная нами проверка показала, что единичные погрешности анализа единичных проб по методике [21] достигают до 60 % даже для проб с высоким содержанием УВ и имеют преимущественно систематический характер [123].

Новый способ определения УВ описан в статье [101]. Он близок способу [21], но имеет следующие отличия:

1) при построении одномерной градуировки и проведении анализа дополнительно измеряют и учитывают поглощение С-Н связей, присутствующих в метильных и метиновых группах углеводородных молекул, в области $\nu_4 = 2855 \text{ см}^{-1}$;

2) при вычислении обобщенного сигнала используют нивелирующие весовые коэффициенты, вычисленные методом наименьших квадратов с использованием спектров поглощения множества модельных углеводородных смесей разного качественного и количественного состава, – это основное отличие новой методики;

3) с учетом п. 1 и 2 обобщенный аналитический сигнал рассчитывают по формуле

$$A_{\Sigma} = 0,127A_1 + 0,288A_2 + 2,55A_3 + 0,134A_4. \quad (5.12)$$

Формулу типа (5.12), так же как градуировку (5.10), в каждой лаборатории следует получать заново, с использованием того же спектрометра и той же кюветы, что и при последующих серийных анализах. Особенно важно уточнять значения коэффициентов k_i в формуле (5.12) при переходе к другому растворителю, так как в этом случае ИК-спектры поглощения растворов, содержащих углеводороды, несколько изменяются.

Нивелирующие регрессионные коэффициенты (k_i) рассчитывают только один раз, при разработке методики. Для этого проводят следующие операции:

а) готовят модельные углеводородные смеси с известным суммарным содержанием УВ, различающиеся по качественному составу и соотношению индивидуальных УВ;

б) измеряют оптическую плотность полученных тетрачлорметановых растворов (смесей), а именно A_1 при $\nu_1 = 2930 \text{ см}^{-1}$, A_2 при $\nu_2 = 2960 \text{ см}^{-1}$, A_3 при $\nu_3 = 3030 \text{ см}^{-1}$ и A_4 при $\nu_4 = 2855 \text{ см}^{-1}$;

в) по результатам измерений составляют переопределенную систему уравнений вида

$$c_j = \sum A_{ij} Z_i, \quad (5.13)$$

где A_{ij} – оптическая плотность раствора j -й смеси при i -й длине волны; Z_{ij} – регрессионные коэффициенты, зависящие от удельных коэффициентов поглощения компонентов при той же длине волны. Индекс i принимает целочисленные значения от 1 до 4, индекс j – от 1 до m , где m – число модельных смесей (объем обучающей выборки); обычно использовали $m = 25$;

г) решают полученную систему линейных уравнений, например с помощью пакета программ Excel; решением являются МНК-оценки регрессионных коэффициентов (далее – Z_i) – их подстановка в (5.13) приводит к многомерной градуировке, позволяющей рассчитывать интегральный показатель (c^*) без вычисления A_Σ (см. раздел 6.1);

д) так как для работников гидрохимических лабораторий более привычна двухэтапная схема расчетов, предполагающая вы-

числение A_{Σ} по формулам типа (5.9) и последующий расчет c^* по заранее построенному одномерному градуировочному графику, рассчитывают весовые коэффициенты (k_i), входящие в искомую формулу и пропорциональные значениям Z_i :

$$k_i = t Z_i. \quad (5.16)$$

Чтобы значения A_{Σ} для всех модельных смесей соответствовали значениям A_i и попадали в область, где результаты измерений оптической плотности хорошо воспроизводимы ($0,05 < A_{\Sigma} < 2,0$), мы приняли пересчетный коэффициент t равным 0,00745. Подстановка найденных по формуле (5.14) значений k_i в (5.11) приводит к искомой расчетной формуле (5.12).

При повторном приготовлении и фотометрировании модельных растворов найденные по формуле (5.12) значения A_{Σ} несколько меняются. Коэффициенты вариации (W) при измерении содержания УВ в очищенном элюате не превышают 3 % отн. Для методики в целом прецизионность несколько хуже. При повторении анализа пробы воды (или водного раствора УВ) коэффициент вариации возрастает до 10–15 % отн, за счет плохо воспроизводимых операций экстрагирования и сорбционной очистки.

Полученная с помощью ГСО нефтепродуктов (смесь Симарда) одномерная градуировка линейна (коэффициент линейной корреляции превышает 0,99), а фоновое поглощение пренебрежимо мало. По нашим данным, для новой методики величина c_{\min} в конечном разбавлении составляет 1,2 мг/дм³, что соответствует 0,06 мг углеводов в 1 дм³ исследуемой воды. Таким образом, разработанная методика имеет практически ту же чувствительность и прецизионность, что и прототип – методика [21].

Дополнительные измерения при 2855 см⁻¹ и использование множества градуировочных смесей для МНК-оценки регрессионных коэффициентов достоверно уменьшают влияние внутригрупповой селективности по сравнению с прототипом – методикой [21] (рис. 5.5). Для выборки, включающей как алканы, так и арены, параметр T удалось снизить с 2,2 до 1,2. Соответственно снизился и уровень систематической погрешности. Новая методика

позволяет определять сумму УВ в любых модельных смесях (независимо от содержания арен) с погрешностями, не превышающими 20 % отн., причем значения погрешностей хорошо воспроизводятся при повторных анализах. Таким образом, полностью исключить влияние систематических погрешностей пока что не удалось. Однако точность определения суммарного содержания УВ по новой методике соответствует требованиям действующих ГОСТов к методикам определения нефтепродуктов [62]. После существенного снижения неопределенности измерительных операций в общем бюджете неопределенности новой методики ведущую роль играют потери УВ при их экстракции.

Отметим, что операции пробоотбора и пробоподготовки в новой методике проводятся точно так же, как в прототипе [21].

Пример 5.3. Анализ модельного водного раствора (имитата сточной воды). Отбирают 500 см³ модельного водного раствора углеводородов с концентрацией от 0,2 до 100 мг/л, подкисляют его соляной кислотой до pH = 2 и помещают в делительную воронку на 1000 см³. Добавляют 20 г хлорида натрия и 25 см³ экстрагента (тетрахлорметана). Делительную воронку интенсивно встряхивают в течение 5 мин, периодически открывая пробку для выпуска паров. По окончании экстракции пробу отстаивают для расслоения водной и органической фазы (в течение 10 мин). После того как смесь расслоится, экстракт переносят в коническую колбу на 50 см³ с притертой пробкой, в которую добавлено 2,5 г безводного сернокислого натрия. Время обезвоживания экстракта составляет 10–20 мин. Экстракт декантируют или фильтруют через стекловату в другую колбу, промывают осушитель небольшим объемом экстрагента, который присоединяют к экстракту. Затем экстракт переносят порциями в подготовленную по хроматографическую колонку с оксидом алюминия (методика подготовки хроматографической колонки описана в ГОСТ Р 51797-2001 [21], следя, чтобы уровень жидкости не опускался ниже верхнего уровня слоя сорбента. Первые 3–4 мл очищенного экстракта (элюата) отбрасывают, а оставшуюся часть элюата собирают в мерную колбу на 25 см³ с притертой пробкой. После пропускания всего экстракта колонку промывают

экстрагентом, присоединяют его к основному элюату и доводят объем до метки. Регистрируют ИК-спектр элюата (очищенного экстракта) в области $2750\text{--}3150\text{ см}^{-1}$ с помощью ИК-фурье-спектрометра FT-801, используя кювету с толщиной слоя $l = 5,00\text{ см}$. Раствор сравнения – чистый растворитель. Измеряют значения оптической плотности при четырех заранее выбранных значениях волновых чисел ($\nu_1 = 2930\text{ см}^{-1}$, $\nu_2 = 2960\text{ см}^{-1}$, $\nu_3 = 3030\text{ см}^{-1}$, $\nu_4 = 2855\text{ см}^{-1}$) соответственно и вычисляют обобщенный аналитический сигнал данной пробы по формуле (5.12). Для построения одномерной градуировки готовят эталонные растворы смеси Симарда с разной суммарной концентрацией УВ. Проводят измерения оптической плотности и вычисления обобщенных аналитических сигналов так же, как описано для раствора пробы. С помощью построенной градуировки находят величину углеводородного индекса анализируемого водного раствора в пересчете на смесь Симарда (в мг/л).

Пример 5.4. Анализ сильнозагрязненной речной воды.

Мерным цилиндром отбирают 1000 или 2000 см^3 (в зависимости от ожидаемого суммарного содержания углеводородов в речной воде) отфильтрованной пробы с $\text{pH} = 2$. Пробу консервируют, как описано в [157], и хранят не более двух суток в холодильнике. В делительную воронку помещают 1000 см^3 анализируемой воды, добавляют 40 г хлорида натрия и 25 см^3 экстрагента (тетрахлорметана). Далее экстрагируют УВ, как описано в [21]. Экстракцию повторяют, экстракты объединяют. Проводят сорбционную очистку объединенного экстракта, как описано в примере 5.3, объем элюата доводят до 50,0 мл чистым тетрахлорметаном. Измерение оптической плотности элюата, вычисление обобщенного сигнала, построение градуировки и расчет интегрального показателя проводят, как в примере 5.3, учитывая объем пробы и объем фотометрируемого элюата.

Правильность определения суммарного содержания УВ в водах разного типа проверяли тремя способами: а) анализ «имитатов», т. е. водных растворов с известным суммарным содержанием УВ, приготовленных с использованием ГСО; б) анализ реальных проб с применением стандартных добавок («введено – найдено»); в) сопоставительный анализ реальных проб с применением разных методик. Все эти способы проверки подтвердили удовлетворительную

точность оценки содержания УВ в водах (± 20 % отн.). Примером может быть табл. 5.11, содержащая результаты анализа трех проб очищенной сточной воды нефтеперерабатывающего предприятия. Приведены данные для проб с известными добавками смеси УВ (ГСО) и без таких добавок. Результаты выражены в пересчете на смесь Симарда. Видно, что добавка определяется правильно, погрешности не превышают 10 %.

Таблица 5.11

Проверка методики определения суммарного содержания нефтепродуктов в сточных водах. Используется способ «введено – найдено»

<i>№ пробы</i>	<i>Найдено без добавки с_г, мг/л</i>	<i>Добавка, мг/л</i>	<i>Найдено с добавкой, мг/л</i>	<i>Найдено в добавке, мг/л</i>	<i>Погрешность, δc, %</i>
3	$1,28 \pm 0,10$	1,50	$2,69 \pm 0,08$	$1,41 \pm 0,10$	6,1
4	$0,48 \pm 0,07$	1,50	$2,12 \pm 0,02$	$1,64 \pm 0,09$	9,2
5	$0,08 \pm 0,05$	1,25	$1,28 \pm 0,13$	$1,20 \pm 0,18$	4,3

Установлено, что в случае применения новой методики к анализу слабозагрязненных природных и сточных вод, содержащих смеси УВ с преобладанием аренов, результат анализа оказываются заниженными (на 30–40 %). Это связано с неполным экстракционным извлечением аренов. Решение выявленной проблемы было достигнуто только после перехода к многомерным градуировкам, учитывающим потери аналитов в ходе экстракции и описанным в разделе 6.1.

5.5.3. Спектрофотометрический способ измерений суммарной антиоксидантной активности пищевых продуктов [149]⁹

Данный способ был разработан специалистами Кубанского госуниверситета и внесен в Федеральный реестр МВИ. Методика измерений антиоксидантной активности пищевых продуктов предназначена для анализа чая, кофе, алкогольных и безалкогольных

⁹ Подраздел подготовлен при участии Т.Г. Цюпка и Н.П. Пикулы.

напитков. Методика применима, если суммарное содержание антиоксидантов, выраженное в пересчете на аскорбиновую кислоту, находится в диапазоне от 50 до 10 000 мг/дм³. Методика основана на воздействии восстановителей образца на индикаторную систему Fe(III)–*o*-фенантролин, при котором Fe(III) восстанавливается до Fe(II) и образует с *o*-фенантролином устойчивый интенсивно окрашенный комплекс (метод FRAP). Измерения оптической плотности проводятся в видимой области спектра на любом спектрофотометре или на фотоэлектроколориметре КФК-2МП. В качестве вещества-стандарта используется аскорбиновая кислота, которая по своим антиоксидантным свойствам занимает промежуточное положение среди восстановителей фенольной и нефенольной природы. Величина АОА пищевых продуктов выражается в мг/дм³ или в мг/г (по аскорбиновой кислоте).

Пример 5.5. Определение АОА чая. Реагент готовят следующим образом: взвешивают 0,1980 г *o*-фенантролина, количественно переносят навеску в термостойкий стакан вместимостью 100 см³, добавляют 30–40 см³ дистиллированной воды и растворяют навеску при слабом нагревании. Взвешивают 0,2892 г железозамонийных квасцов, переносят в термостойкий стакан вместимостью 100 см³, добавляют 30–40 см³ дистиллированной воды и с помощью пипетки добавляют 2,0 см³ соляной кислоты концентрацией 1 моль/дм³. Навеску растворяют при слабом нагревании. Полученные растворы переносят в колбу вместимостью 100,0 см³, перемешивают и доводят объем до метки дистиллированной водой. После приготовления комплексный реагент необходимо выдержать не менее 12 ч.

Навеску чая массой 2,500 г, взвешенную с точностью до 0,001 г, помещают в коническую колбу вместимостью 250 см³, приливают 200 см³ кипящей дистиллированной воды и выдерживают на водяной бане в течение 45 мин. Полученный экстракт фильтруют в мерные колбы вместимостью 250 см³, охлаждают до комнатной температуры и доводят до метки дистиллированной водой. С помощью микродозатора или пипетки отбирают 0,01–0,05 см³ ($V_{\text{пр}}$) полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100,0 см³, прибавляют 1,0 см³ комплексного реагента и доводят объем до мет-

ки дистиллированной водой. Через 60 мин прибавляют 2,0 см³ раствора 0,5 моль/дм³ фтористого натрия. Через 30 мин измеряют оптическую плотность при $\lambda = 490$ нм в кюветах (20 мм) относительно дистиллированной воды.

Для построения градуировочного графика в каждую из 10 мерных колб вместимостью 100,0 см³ наливают с помощью мерного цилиндра примерно по 50 см³ дистиллированной воды, добавляют по 1,0 см³ комплексного реагента. Затем добавляют с помощью мерной пипетки отдельно в каждую колбу разные объемы рабочего раствора аскорбиновой кислоты и доводят объем в каждой колбе до метки дистиллированной водой. Содержание аскорбиновой кислоты в приготовленных растворах равно соответственно 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 2,0 мг/дм³. Растворы в каждой колбе перемешивают. Через 60 мин в каждую колбу с помощью мерной пипетки прибавляют по 2,0 см³ раствора фтористого натрия и проводят измерение оптической плотности, как описано выше. Строят график зависимости величины оптической плотности от содержания аскорбиновой кислоты. Уравнение регрессии получают, обрабатывая полученные данные методом наименьших квадратов. Градуировочную характеристику проверяют не реже одного раза в квартал и обязательно при каждом новом приготовлении растворов не менее чем по трем точкам, равномерно распределенным по диапазону измерения. При оперативном контроле прецизионности измерений используют предел повторяемости (r), равный $0,28 \cdot \bar{X}$, где \bar{X} – среднее арифметическое из двух результатов параллельных измерений. В ходе метрологической аттестации были установлены значения показателей повторяемости (10 %), воспроизводимости (18 %) и точности (30 %). Показатель правильности не рассчитывался ввиду отсутствия ГСО и стандартных методик. Указанные значения метрологических характеристик относятся к интервалу значений АОА от 5 до 10 000 мг/дм³. Значение антиоксидантной активности, выраженное в мг АК на 1 дм³ чайного настоя, рассчитывают по формуле:

$$AOA = \frac{C_{AK} \cdot V_k}{V_{пр}},$$

где C_{AK} – содержание аскорбиновой кислоты, найденное по градуиро-

вочному графику или уравнению регрессии, мг/дм³; V_k – объем колбы, равный 100 см³; $V_{пр}$ – объем пробы, взятой для измерений, см³.

При необходимости результат анализа можно пересчитать на массу сухого чая. Аналогичные методики разработаны для определения показателя AOA FRAP кофе, пива, фруктовых соков и вин. Эти методики успешно используются для массового анализа пищевых продуктов в контрольно-аналитической лаборатории. Примером могут быть результаты анализа некоторых продуктов, выраженные в пересчете на моль/л аскорбиновой кислоты (табл. 5.12) и опубликованные в работе [107].

Полученные результаты коррелируют со значениями других интегральных показателей, характеризующих суммарное содержание ЕТ-антиоксидантов, в частности полифенолов.

Таблица 5.12

Результаты анализа пищевых продуктов по методике [149]

<i>Анализируемый образец</i>	<i>АОА, ммоль АК на 1 л пробы</i>	<i>S_r</i>
Чай Dilmah, крупнолистовой черный	0,45 ± 0,05	0,10
Кофе Milagro Gold, растворимый, сублимированный	0,85 ± 0,04	0,04
Пиво светлое	0,97 ± 0,06	0,10
Коньяк «Старый Кенигсберг» (4 года)	1,6 ± 0,2	0,06
Сок «Туса-Джуса», яблоко, осветленный, восстановленный	2,95 ± 0,05	0,09
Вино «Шардоне», белое полусладкое	10,2 ± 0,3	0,01
Вино «Мерло», красное полусладкое	12,6 ± 0,3	0,01
Вино «Каберне», красное сухое	15,2 ± 0,4	0,01

Глава 6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ ОДНОТИПНЫХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОЖЕСТВА СТАНДАРТОВ. МНОГОМЕРНЫЕ ГРАДУИРОВКИ И ИНТЕРВАЛЬНЫЕ ОЦЕНКИ

6.1. Построение и применение многомерных градуировок

6.1.1. Методологические аспекты проблемы

В предыдущих главах было показано, что нивелирование коэффициентов чувствительности однотипных веществ и подбор оптимального стандарта повышают точность оценки c_{Σ} в пересчете на концентрацию стандарта. Однако полностью исключить систематическую погрешность не удастся даже при проведении многоволновых измерений. Обычно это считают следствием неустранимых отличий состава и свойств стандарта от состава и свойств смеси аналитов, присутствующих в анализируемой пробе. Так, смесь Симарда, в отличие от присутствующих в воде нефтепродуктов, не содержит циклоалканов и алкиларенов, и чувствительность ее определения по одномерной градуировке несколько отличается от чувствительности определения нефтепродуктов, особенно если в них высока доля аренов. Однако можно охарактеризовать ту же причину более широко: применяя единственный стандарт, мы в принципе не можем добиться соответствия его свойств (в частности, удельного коэффициента поглощения) сразу всем смесям веществ данной группы, присутствующим в исследуемых пробах. Давно замечено: «Все́м не угоди́ть!»

С проблемой соответствия состава (свойств) стандарта и состава (свойств) исследуемых проб аналитики столкнулись давно. Эта проблема возникает не только при определении суммарных содержаний однотипных веществ, но и при определении любого индивидуального вещества в присутствии других компонентов пробы. В последнем случае несовпадение свойств стандарта и пробы проявляется в форме наложения сигналов посторонних веществ на сигнал аналита, хотя этот механизм – далеко не единственный. Можно уменьшить возникающие систематические погрешности, используя стандарт, включающий те же мешающие вещества, что и проба, или меняя условия измерения сигнала, но этому мешает непредсказуемость и вариабельность состава пробы.

Проблему соответствия можно решить, используя многомерные градуировки [150]. Немногочисленные поклонники применения математических методов в химическом анализе давно поняли, что использование многомерных градуировок может помочь и при раздельном определении индивидуальных веществ [134], и при определении суммарного содержания однотипных веществ [174]. Идея очень проста – *если единственный стандарт не может обеспечить правильность анализа множества проб, различающихся по составу и свойствам, то следует совместно использовать множество разных стандартов!* Формируемые многомерные математические модели должны учитывать и наложения сигналов, и взаимодействия аналитов, и влияние посторонних веществ, обеспечивая правильность результатов анализа.

Привлекательность многомерных градуировок для химиков-аналитиков определили три фактора: а) простота основной идеи, б) возможность ее воплощения известными средствами регрессионного и/или матричного анализа, в) появление персональных компьютеров, позволяющих быстро строить любые многомерные градуировки с помощью стандартных программ. Для построения многомерных градуировок лучше использовать экспериментальные данные, характеризующие не чистые вещества, а многокомпонентные пробы известного состава [136]. Простейшие много-

мерные градуировки связывают некоторое измеряемое свойство многокомпонентной системы (A) с концентрациями ее компонентов: $A = f(C_1, C_2, \dots, C_n)$. Естественно, при раздельном определении компонентов потребуется множество таких уравнений, например, построенных для разных длин волн. Известны также многомерные градуировки, связывающие концентрацию компонента с разными измеряемыми свойствами системы: $C = f(A_1, A_2, \dots, A_n)$. В частности, такие градуировки используют при определении суммарного содержания однотипных веществ методом многоволновой спектрометрии. Однако наиболее перспективно формирование сложных моделей, связывающих множество концентраций компонентов (C_i) с множеством измеренных аналитических сигналов (A_i) в виде соответствующих матриц [175].

Многомерные градуировки (линейные или нелинейные) нужны для решения самых разных химико-аналитических задач (см. обзоры [175; 176]). Например, для решения классификационных задач с помощью мультисенсорных систем типа «электронный язык» [177]; для разложения спектра смеси на составляющие [178], для раздельного определения однотипных компонентов пробы [179] и во многих других случаях. Начиная с 1990-х гг., многомерные градуировки применяют и для определения суммарного содержания однотипных веществ. При этом содержания отдельных веществ, как правило, не рассчитывают. Искомую величину c_{Σ} выражают не в пересчете на стандартное вещество, а в обычных единицах характеризующих количество вещества, например, моль/л или % масс. [13; 134]. Таким образом, речь идет не о субъективных **оценках** (как при использовании пересчетных интегральных показателей), а о метрологически корректном **определении** содержания веществ.

Для построения и применения сложных многомерных градуировок используют методы матричного анализа и разработанные на их основе хемометрические алгоритмы [15; 175; 180]. Созданы специализированные компьютерные программы, реализующие те или иные алгоритмы без прямого участия аналитика.

Нередко аналитик не понимает, как именно проводится обработка введенных им в компьютер спектров или вольтамперных кривых, но с удовольствием использует стандартные программы построения многомерных градуировок, например программу Unscrambler [181]. У аналитика есть собственные задачи: приготовить или проанализировать по референтной методике множество смесей, моделирующих состав проб («обучающая выборка»), измерить для каждой смеси аналитические сигналы A_{ij} (или просто снять спектры смесей), ввести полученные данные в компьютер и выбрать подходящий алгоритм обработки данных. После получения градуировки аналитик должен проверить ее адекватность, оценить точность модели и определить, где ее можно и нужно применять.

Последующий массовый анализ однотипных проб производится в автоматизированном режиме с помощью ранее полученной многомерной градуировки, хранящейся в памяти компьютера. Обработка спектра единичной пробы занимает всего несколько минут. Автоматизированные методики такого типа уже используются в контрольно-аналитических лабораториях, особенно в нефтехимии и в фармацевтической промышленности [182; 183].

С точки зрения аналитика, при определении суммарного содержания однотипных веществ многомерные градуировки имеют серьезные преимущества по сравнению с привычными одномерными градуировками, а именно:

➤ Регрессионные коэффициенты (K_i) можно рассчитать так, чтобы **минимизировать погрешности** количественного анализа. Естественно, переход от одномерной градуировки к многомерной снизит погрешности анализа не для всех проб; для каких-то проб погрешность δc может даже вырасти (по модулю). Речь идет о снижении обобщенных погрешностей, характеризующих совокупность всех проб ($RMSEP$ и т. п.), а также об уменьшении предельной погрешности δc_{\max} .

➤ Компьютерные программы, с помощью которых рассчитывают и применяют многомерные градуировки, позволяют использовать **всю** информацию, содержащуюся в спектре анализи-

руемой пробы, не ограничиваясь 3–4 заранее выбранными АДВ. Измерение сигналов с некоторым заданным шагом производится автоматически. При шаге в 1 нм спектр пробы характеризуется сотнями, а при шаге в 0,1 нм – тысячами значений сигналов. Обработка данных, полученных с малым шагом в широком диапазоне длин волн, часто приводит к более точным результатам анализа [136], хотя это правило имеет немало исключений.

➤ Используя многомерные градуировки, по спектру пробы можно одновременно определять и суммарное содержание компонентов некоторой группы, и групповой состав соответствующей смеси аналитов. Соответствующие методики характерны для спектromетрии в ближней ИК-области (БИК-спектromетрия). Специалисты успешно применяли многомерные градуировки и в других спектроскопических методах, можно назвать работы Е.В. Шабановой, И.С. Якимова, Ю.Б. Монаховой (см. обзор [176]).

6.1.2. Многомерные градуировки для определения углеводов

Логика исследований в области многоволновой ИК-спектromетрии углеводородных смесей привела специалистов ОмГУ к переходу от одномерных к многомерным градуировкам. Их можно рассматривать как способ вычисления ИП особого (пятого?) типа, основанных на одновременном применении множества стандартов. Но, с точки зрения автора этой книги, такие ИП не соответствовали бы предложенной дефиниции и резко отличались бы по своим метрологическим характеристикам от остальных ИП. Поэтому правильнее рассматривать многомерные градуировки как особый способ определения суммарного содержания веществ, более точный, чем применение интегральных показателей.

Если ИП вычисляют, пользуясь методами многоволновой спектromетрии (см. подраздел 5.5.2), то при том же наборе АДВ точность оценки суммарного содержания УВ можно повысить, используя многомерные градуировки вида

$$c^* = K_1A_1 + K_2A_2 + \dots + K_nA_n.$$

Соответствующие эксперименты вначале проводили на модельных смесях. Затем полученные многомерные градуировки проверяли и модифицировали в анализе гидрохимических объектов. Результаты опубликованы в работах [101; 154; 184]. Отметим, что для ИК-спектрометрического определения содержания УВ в природных и сточных водах многомерные градуировки ранее не использовались; во всяком случае, найти соответствующие методики нам не удалось.

Растворы индивидуальных УВ готовили по точным навескам реактивов х.ч., добавляя CCl_4 до заданного объема, как описано в [21]. Было приготовлено 45 смесей разного качественного состава, содержащих от 4 до 6 индивидуальных УВ (алканы, циклоалканы, арены). Примером могут быть смеси, охарактеризованные в табл. 6.1; в обучающую выборку вошли 25 случайно выбранных смесей (№ 1–25), в тест-выборку – остальные смеси.

Таблица 6.1

Состав некоторых смесей углеводородов из обучающей выборки

№ смеси	Доля компонентов (% масс.) в их смеси											c_{Σ} мг/дм ³
	Б	Т	ОК	К	А	Г	ИО	Д	ГД	ЦП	ЦГ	
1	–	–	–	–	–	–	19,8	–	53,1	11,8	15,3	41,9
2	–	5,5	30,0	–	–	19,7	10,0	–	–	30,0	4,8	41,8
3	24,9	–	20,0	–	–	10,0	–	10,1	–	15,0	20,0	50,0
4	–	5,40	–	–	4,80	–	15,0	–	20,0	29,8	25,0	27,6
5	10,1	–	20,0	–	–	4,80	–	20,1	–	5,11	39,9	26,2
6	–	44,6	–	–	5,00	–	10,2	–	24,7	15,5	–	10,8
7	–	35,5	–	4,90	5,00	–	–	–	–	39,4	15,2	77,6

Примечание. Бензол (Б), толуол (Т), *о*-ксилол (ОК), кумол (К), антрацен (А); *н*-гексан (Г), изооктан (ИО), *н*-декан (Д), гексадекан (ГД); циклопентан (ЦП), циклогексан (ЦГ).

За 100 % принята суммарная концентрация компонентов смеси в тетрахлорметановом растворе (c_{Σ}), выраженная в мг/дм³.

Спектры поглощения всех растворов регистрировали в области $2750\text{--}3150\text{ см}^{-1}$ с помощью ИК-фурье-спектрометра ФТ-801. Использовали кювету из ZnSe с толщиной слоя $l = 5,00\text{ см}$. Раствор сравнения – чистый растворитель. Оптическую плотность растворов вначале измеряли при четырех значениях волновых чисел, а именно $2855, 2930, 2960$ и 3030 см^{-1} , выбранных в результате сопоставления спектров поглощения разных УВ в CCl_4 . В дальнейшем использовали ИК-спектры тех же смесей, охарактеризованные значениями оптической плотности, которые автоматически измерялись с шагом $0,5\text{ см}^{-1}$. Таким образом, спектр каждой смеси был представлен в виде 800 значений оптической плотности. Все измерения повторяли трижды, заново готовя растворы и усредняя результаты измерений. Многомерные градуировки получали по алгоритму PLS-1 с помощью программы Unscrambler Client 9.8. Для сравнения величину c^* рассчитывали тремя разными способами, а именно:

Методика А. Обобщенный аналитический сигнал УВ рассчитывали по выведенной в работе [101] формуле, включающей результаты измерения оптической плотности при 4 АДВ и нивелирующие весовые коэффициенты

$$A_{\Sigma} = 0,127A_1 + 0,288A_2 + 2,55A_3 + 0,134A_4. \quad (6.1)$$

Затем строили одномерную градуировку вида $A_{\Sigma} = a + bc_X$ по 5–7 растворам смеси Симарда (ГСО 7822-2000) в CCl_4 , используя метод наименьших квадратов (МНК). Затем вычисляли значения A_{Σ} для смесей из тест-выборки и находили значения c^* по этой градуировке.

Методика Б. Не рассчитывая величину A_{Σ} , находили значения c^* по градуировке

$$c^* = 17,0A_1 + 38,7A_2 + 342A_3 + 18,0A_4. \quad (6.2)$$

Для вывода этой формулы использовали значения A_{ij} , полученные для смесей из обучающей выборки при тех же 4 длинах волн, что и в предыдущей методике. Одномерные градуировки

не строили, результаты анализа в пересчете на смесь Симарда не выражали.

Методика В. Исходными данными были ИК-спектры 25 смесей из обучающей выборки, зарегистрированные в области $2750\text{--}3150\text{ см}^{-1}$ с шагом $0,5\text{ см}^{-1}$ ($n = 800$). После обработки этим спектров с помощью программы Unscrambler получали математическую модель светопоглощения. Затем с помощью полученной модели рассчитывали значения c^* для смесей из тест-выборки. Использовали шесть главных компонент (ГК) – дальнейший рост числа ГК не улучшает точность анализа. Расчеты вели в автоматическом режиме, продолжительность расчета для единичной пробы – до 2 мин.

Анализ каждой смеси из тест-выборки повторяли трижды по каждой из методик, результаты обрабатывали по Стьюденту ($P = 0,95$). Погрешности оценки c_{Σ} рассчитывали по формуле (2.1). Погрешность анализа разных смесей по одной методике характеризовали обобщенно, используя параметр *RMSEP* (*root mean squared error of prediction*) [15]:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m (c_j^* - c_{\Sigma j})^2}{m}},$$

где m – объем выборки; c_j^* и $c_{\Sigma j}$ – найденное и действительное суммарное содержание УВ в j -й смеси.

Как было установлено в предварительных опытах, методики А, Б и В имеют близкие коэффициенты вариации (W), не превышающие 2 % отн., и позволяют определять суммарное содержание УВ в модельных растворах на одном и том же концентрационном уровне (5–100 мг/л). Способ расчета влияет лишь на правильность результатов, характеризуемую значениями δc (погрешность анализа единичной смеси) и величиной *RMSEP* (обобщенная погрешность анализа всех смесей из тест-выборки).

Пересчет обобщенного сигнала на смесь Симарда (методика А) приводил к завышенным оценкам c_{Σ} , величина δc иногда

доходила до 15 %. В 90 % случаев действительная величина c_{Σ} не входила в доверительный интервал значений c^* , найденных по одномерной градуировке, т. е. почти все результаты анализа содержали неисключенную систематическую погрешность (табл. 6.2).

Таблица 6.2

**Результаты анализа десяти смесей УВ из тест-выборки
по разным градуировкам**

№ смеси	c_{Σ} , мг/дм ³	c^* , мг/дм ³			δc , %		
		A	B	B	A	B	B
26	58,5	57,0 ± 2,4	54,1 ± 2,3	58,8 ± 1,5	-2,6	-7,6	0,5
27	55,0	60,2 ± 2,0	57,1 ± 1,8	54,9 ± 1,5	9,5	4,0	-0,1
28	44,6	49,5 ± 1,8	46,8 ± 1,8	46,0 ± 1,4	11,0	4,8	3,2
29	30,2	34,4 ± 2,6	32,1 ± 2,5	31,8 ± 1,4	13,9	6,3	5,3
30	56,0	62,1 ± 3,3	59,0 ± 3,0	56,6 ± 1,4	10,9	5,4	1,2
31	51,8	53,2 ± 1,3	50,3 ± 1,3	51,5 ± 1,5	2,6	-2,9	-0,7
32	54,0	57,5 ± 0,6	54,5 ± 0,7	54,9 ± 1,4	6,3	0,8	1,6
33	40,2	43,8 ± 1,3	41,2 ± 1,2	41,5 ± 1,4	8,9	2,6	3,4
34	56,0	58,4 ± 1,1	55,4 ± 1,1	53,2 ± 1,4	4,3	-1,0	-4,9
35	73,3	75,9 ± 1,1	72,4 ± 1,1	70,7 ± 1,6	3,5	-1,2	-3,6
<i>RMSEP</i> , мг/дм ³					3,8	2,2	1,5

Примечание. Выделены жирным шрифтом результаты, содержащие значимую систематическую погрешность.

Вычисление многомерной градуировки (методика Б) позволило при тех же исходных данных получить более точные результаты. Единичные погрешности анализа смесей из тест-выборки (δc) по модулю не превышали 8 %. По сравнению с методикой А величина *RMSEP* снизилась почти в два раза, составляя менее 5 % среднего содержания УВ в анализируемых смесях. Систематическую погрешность удалось исключить (свести до статистически незначимого уровня) примерно в 50 % анализов.

Переход к методике В (обработка полных ИК-спектров) привел к дальнейшему снижению $RMSEP$. Единичные значения δc для методики В не превышали 6 %. Устранить систематическую погрешность удалось в 16 случаях из 20 (80 %). Следовательно, выигрыш в точности по сравнению с методикой Б налицо, но он относительно невелик. Надо учесть, что для реализации методики В лицензионная программа Unscrambler нужна в ходе анализа каждой пробы, тогда как для анализа тех же проб по методике Б достаточно калькулятора, лицензионное программное обеспечение нужно только при расчете многомерной градуировки (6.2), т. е. при разработке методики. Очевидно, небольшое снижение δc , достигаемое при регистрации полного ИК-спектра пробы, не компенсирует усложнения методики. Поэтому дальнейшие исследования проводили, используя сравнительно простую многомерную градуировку (6.2), т. е. методику Б, а не более точную методику В.

6.1.3. Анализ водных растворов. Учет потерь

В отличие от модельных смесей УВ, результаты анализа имитатов (водных растворов, содержащих известные количества эмульгированных и растворенных УВ) нередко давали неудовлетворительные результаты, независимо от того, какая из трех вышеописанных многомерных градуировок использовалась. Наибольшие погрешности наблюдались для тех имитатов, которые представляли собой очень разбавленные растворы смесей УВ с преобладанием арен. По опубликованным в научной литературе данным, более растворимые в воде арены экстрагируются хуже, чем циклоалканы и алканы [55; 57]. Проверка показала, что причиной выявленных погрешностей является неполное извлечение УВ из водной фазы; для полного извлечения УВ в тетрахлорметан однократного контакта фаз недостаточно. Учитывая токсичность тетрахлорметана, усложнять методику пробоподготовки (повторные экстракции с объединением экстрактов) нежелательно. Кроме того, такие изменения понизят степень концентрирования УВ. Вводить эмпирически установленные поправочные коэф-

фициенты также нельзя, поскольку потери УВ при экстракции меняются от пробы к пробе, в зависимости от содержания аренов, а возможно – и от других факторов (табл. 6.3). Мы предлагаем не усложнять методику пробоподготовки, а учитывать неполноту и неаддитивность экстракционного извлечения УВ заранее, на стадии построения многомерной градуировки.

Таблица 6.3

Результаты анализа имитатов природных вод по многомерным градуировкам без учета (Б) и с учетом (Б2) потерь УВ в ходе пробоподготовки

№ имитата	Введено, c_{Σ} , мг/дм^3	Найдено, c^{**} , мг/дм^3		δc , %	
		Б	Б2	Б	Б2
26	3,10	$1,96 \pm 0,01$	$3,31 \pm 0,02$	–37	6,8
27	3,36	$1,92 \pm 0,02$	$3,32 \pm 0,03$	–43	–1,1
28	4,97	$3,01 \pm 0,02$	$5,17 \pm 0,04$	–39	4,1
29	3,48	$2,02 \pm 0,05$	$3,32 \pm 0,09$	–42	–4,6
30	4,76	$2,92 \pm 0,04$	$5,04 \pm 0,07$	–38	5,9
$RMSEP$, мг/дм^3				1,53	0,16

Если степень извлечения УВ из имитатов, включаемых в обучающую выборку, будет примерно такой же, как при анализе реальных проб, систематические погрешности анализа значительно снизятся. Применение градуировок, учитывающих потери анализа в ходе пробоподготовки, является редко применяемым, но хорошо известным специалистам и эффективным приемом, но при ИК-спектрометрическом определении УВ его не использовали.

Для реализации этой идеи была составлена новая обучающая выборка, в которую вошли 25 имитатов с известными значениями c_{Σ} , в том числе содержащие арены. Суммарная концентрация УВ в этих имитатах составляла от 0,8 до 10 мг/дм^3 . Для приготовления имитата в мерную колбу на 100 мл наливали 50 мл дистиллированной воды, взвешивали, вводили 10–20 $\text{мг } j$ -й смеси УВ без CCl_4 , вновь взвешивали колбу на аналитических весах и дово-

дили до метки водой. Полученный раствор тщательно перемешивали, брали аликвоту и количественно переносили ее в мерную колбу на 1000,0 мл. Полученный раствор подкисляли серной кислотой до $\text{pH} < 2$, доводили дистиллированной водой до метки и переносили в бутылку из темного стекла с притертой крышкой. Обычно имитаты анализировали в день приготовления. В ходе анализа смесь УВ переводили из 500 мл имитата в 25 мл тетрахлорметана, как описано в [21]. Общее время контакта фаз – 15 мин. Экстракт обезвоживали, пропускали через колонку с Al_2O_3 и вновь доводили объем очищенного экстракта до 25,0 мл. Измеряя оптические плотности экстрактов при четырех значениях волновых чисел (см. выше), получили систему из 25 линейных уравнений. Ее решением стала новая многомерная градуировка

$$c^{**} = 2,31A_1 + 2,66A_2 + 37,56A_3 + 0,94A_4. \quad (6.3)$$

Символ c^{**} обозначает результат анализа, выраженный в мг УВ на литр анализируемого водного раствора. Так как в ходе пробоподготовки идет концентрирование УВ, $c^{**} \ll c^*$. Соответствующий вариант ИК-спектрометрии далее обозначен как методика Б2. Тест-выборка включала 10 имитатов, содержащих от 2 до 6 мг УВ в литре воды. Как видно из табл. 6.3, методика Б2 ведет к достаточно точным оценкам суммарного содержания УВ в имитатах, несмотря на разнообразие соответствующих углеводородных смесей, которые содержали от 0 до 100 % аренов. Единичные значения δs не превышали 7 %. Величина $RMSEP$ для методики Б2 оказалась менее 3 % от среднего содержания УВ. Время анализа единичной пробы с применением многомерной градуировки (6.3) составляло примерно 1,5 ч.

6.1.4. Анализ природных и сточных вод с применением многомерных градуировок

Хорошие результаты анализа имитатов по методике Б2 дали основание применить ее в анализе природных и сточных вод. Результаты анализа сточных вод по методике Б2 имели хорошую сходимость, но достоверно отличались от результатов, получен-

ных лабораториями соответствующих предприятий по стандартным методикам (табл. 6.4). На предприятиях суммарное содержание УВ в сточных водах определяли согласно ПНД Ф 14.1:2.5-95 (однократная экстракция, одномерная градуировка, $X_{ст}$ – смесь Симарда). По-видимому, выявленные расхождения вызваны неполным экстракционным извлечением УВ, что не учтено в стандартных методиках. Имеет значение и внутригрупповая селективность, искажающая результаты, полученные по стандартной методике.

Таблица 6.4

Результаты анализа реальных проб по методике Б2 (c^{} , мг/дм³)**

<i>Проба</i>	<i>Тип воды</i>	<i>Методика Б2</i>	<i>Данные предприятия</i>
1/1	сточная	$4,75 \pm 0,08$	1,78
1/2	сточная	$1,73 \pm 0,05$	0,76
1/3	сточная	$1,28 \pm 0,10$	0,90
2/1	сточная	$0,48 \pm 0,07$	не обнаруж.
3/1	речная	$0,08 \pm 0,07$	не обнаруж.

Правильность полученных в ОмГУ результатов была подтверждена в ходе дополнительных исследований. Они включали анализ ГСО разного типа (табл. 6.5) и проверку результатов анализа сточных вод методом «введено – найдено» (табл. 6.6).

Таблица 6.5

Результаты анализа водных растворов, приготовленных из ГСО, содержащих известные количества УВ в водорастворимой матрице, по методике Б2

<i>Тип раствора</i>	<i>Введено, C_{Σ}, мг/л</i>	<i>Найдено*, C_{Σ}, мг/л</i>	<i>δC, %</i>
ГСО 7117-94	1,0	$0,98 \pm 0,03$	2,0
ГСО 7117-94	0,50	$0,52 \pm 0,02$	4,1
ГСО 8827-06	0,50	$0,53 \pm 0,02$	6,0

* Здесь и далее рассчитано по результатам трех независимых анализов ($P = 0,95$).

Таблица 6.6

**Проверка правильности результатов анализа сточных вод
по методике Б2**

<i>№ пробы сточной воды</i>	<i>Добавка, мг/дм³</i>	<i>Найдено*, мг/дм³</i>	<i>Найдено в добавке, мг/дм³</i>	<i>W, %</i>	<i>«Открываемость добавки», %</i>
3	— 1,50	$1,28 \pm 0,10$ $2,69 \pm 0,08$	1,41	8,5	94
4	— 1,20	$6,89 \pm 0,09$ $8,15 \pm 0,11$	1,26	11,9	105
5	— 1,20	$4,32 \pm 0,06$ $5,45 \pm 0,08$	1,13	8,3	94
6	— 1,50	$0,48 \pm 0,07$ $2,12 \pm 0,02$	1,64	4,9	109
7	— 1,25	$0,08 \pm 0,07$ $1,28 \pm 0,13$	1,20	11,8	96

Результаты проведенного исследования подтверждают целесообразность использования многоволновой ИК-спектрометрии для оценки суммарного содержания углеводов без их разделения. При использовании нивелирующих коэффициентов этот метод позволяет довольно точно оценивать суммарное содержание УВ в многокомпонентных модельных растворах (растворитель – CCl_4) даже по одномерной градуировке, в пересчете на смесь Симарда. В этом случае относительные погрешности анализа единичных углеводородных смесей не превышают 15 % отн., без учета потерь в ходе пробоподготовки. Дальнейшее снижение погрешности анализа требует отказа от единого стандартного вещества и перехода к расчету суммарного содержания УВ по многомерной градуировке, заранее полученной с применением множества углеводородных смесей разного состава. При формировании обучающей выборки следует учитывать возможный состав смесей УВ в природных и сточных водах. По нашим данным, применение многомерных градуировок Б или В позволяет оценить суммарное содержание УВ в модельных углеводородных смесях

с погрешностью, не превышающей 8 % отн. Однако такие методики дают заниженные результаты в анализе природных и слабозагрязненных сточных вод, особенно содержащих углеводородные смеси с высокой долей аренов. Очевидно, использование многоволновой спектromетрии и многомерных градуировок в анализе реальных объектов настолько повышает точность заключительных стадий анализа, что преобладающими становятся погрешности, возникающие в ходе пробоподготовки.

Выходом из положения оказалось построение многомерной градуировки не по модельным смесям УВ, а по экстрактам из имитаторов известного состава (методика Б2) или из реальных проб с точно известным суммарным содержанием УВ (при наличии подходящих референтных методик анализа). Влияние потерь в ходе экстракционного выделения и сорбционной очистки углеводородных смесей при построении градуировки и в ходе анализа приблизительно одинаково, и погрешности анализа снижаются до уровня 10 %, включая влияние потерь. Это соответствует требованиям к точности методик определения нефтепродуктов в водах [62]. Очевидно, многомерные градуировки могут быть положены в основу новых стандартных методик анализа реальных объектов, содержащих углеводороды (сточные и природные воды, почвы, технические нефтепродукты и т. п.). К сожалению, низкая чувствительность метода ИК-спектromетрии и сравнительно невысокие коэффициенты концентрирования УВ не позволяют использовать методику Б2 для анализа слабозагрязненных природных вод. Более сложные методики типа В, основанные на обработке больших массивов спектральных данных с помощью хемометрических алгоритмов, выгоднее использовать для решения более трудной задачи – определения группового состава нефтепродуктов.

6.2. Многомерные градуировки при определении отдельных групп УВ в бензине

6.2.1. Структурно-групповой состав бензинов и способы его определения

Бензины – сложные смеси углеводородов, относящихся к разным структурным группам. В любом бензине присутствует не менее сотни индивидуальных УВ, их содержания не определяют, за исключением некоторых аренов (бензол). Вместо этого определяют показатели структурно-группового состава (СГС), т. е. суммарные содержания одготипных УВ, выраженные в % масс. Показатели СГС могут иметь разную степень структурного обобщения. Обычно используют четыре характеристики – суммарные содержания алканов (парафинов), циклопарафинов (нафтенгов), ароматических углеводородов (аренов) и непредельных углеводородов (олефинов). Знание этих показателей необходимо для управления технологическими процессами. Исследователям требуется более высокая степень детализации [19], в частности раздельное определение *n*-алканов и изоалканов, пяти- и шестичленных циклопарафинов и т. п. Показатели СГС в России не нормируются – в основном из-за сложности определения этих показателей. В товарных бензинах надо определять лишь суммарное содержание аренов. Так, в составе бензина АИ-92 должно быть не более 45 % аренов. Однако техническая документация предприятий-изготовителей, а также стандарты ASTM предполагают измерение всех четырех показателей СГС. Известно множество способов их определения. Чаще всего используют метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Применяют капиллярные колонки высокого разрешения, обеспечивающие разделение любых легких УВ за 3–4 ч. Заметим, что методом ГЖХ определяют не полный индивидуальный состав бензина, а лишь его легкие компоненты, принимая их сумму за 100 %. Парафины определяют обычно до С₉ [30], арены – до 1,2,3-триметилбензола, непредельные – до 2-бутена-2 [185]. Поскольку сигналы пересчитывают на произ-

вольно выбранный стандарт (суммарное содержание некоторых соединений), найденное значение СГС можно рассматривать как своеобразный интегральный показатель, который может и не совпасть с аналогичным показателем СГС, найденным другим методом. В лучших методиках используют хроматографы высшего класса, оснащенные системами компьютерной идентификации и базами данных по характеристикам удерживания. Для расчета показателей СГС опознают все пики на соответствующей хроматограмме, устанавливают относительное содержание каждого углеводорода и суммируют содержания однотипных УВ.

«Хроматографические» методики определения СГС регламентированы национальными и международными стандартами. Примером может быть стандарт ASTM [30]. В последние годы для анализа бензиновых фракций широко используют рекомендуемый ASTM метод PIONA и программный продукт PIANO (Analytical Automation Specialists, Inc.), который обрабатывает хроматографические данные и выдает отчет об индивидуальном и групповом составе смеси. База данных содержит характеристики 364 углеводородов и включает практически все компоненты бензинов. Метод PIONA позволяет достаточно надежно проводить анализ прямых бензинов. Однако, как показано Д.Ю. Полухиним, И.А. Ревельским и их соавторами [35], для каталитических бензинов, которые богаты олефинами и аренами, этот метод дает неудовлетворительные результаты: некоторые показатели СГС оказываются завышенными или заниженными в 1,5–2 раза. Причина – неверное опознание части пиков. Переход к другим вариантам компьютерной идентификации [186] позволяет получать удовлетворительные результаты и для этих бензинов. Таким образом, хроматографические методики дают очень подробную информацию о составе углеводородных смесей, однако ее правильность не гарантируется, а длительность анализа не позволяет оперативно контролировать технологические процессы и управлять ими. Нужны новые методики, не уступающие «хроматографическим» по надежности и чувствительности, но более экспрессные.

Показатели СГС можно находить многими инструментальными методами (см. руководство Дж. Спейта [7]). Раньше это делали на основе обобщенных характеристик пробы (показатель преломления, плотность и т. п.) по эмпирически выведенным формулам, но точность определения суммарных содержаний в этом случае недостаточна. Суммарное содержание аренов можно найти по светопоглощению пробы в УФ-области, суммарное содержание олефинов – по результатам редокс-титрования. В последние годы для одновременного определения показателей СГС нефтей и нефтепродуктов в ходе научных исследований стали использовать спектроскопию ЯМР и масс-спектрометрию. Однако этот вариант анализа слишком сложен для контрольно-аналитических лабораторий нефтеперерабатывающих предприятий.

С методом ГЖХ успешно конкурирует только ИК-спектрометрия. Для определения показателей группового состава нефтепродуктов этот метод стали применять лишь в конце XX в. Проблема заключается в том, что изолированных областей специфического поглощения тех или иных углеводородных структур в ИК-спектрах вообще нет, поэтому определить показатели СГС прямо по градуировочным графикам, построенным на единичной длине волны, не удастся [7]. Лучше других показателей определяется общее содержание аренов – по пиковой или интегральной интенсивности полосы поглощения в области 1600 см^{-1} . Градуировку ведут по стандартным смесям, содержащим различные ароматические углеводороды. Одномерную градуировку можно получить и по реальным образцам нефтепродуктов, в этом случае их заранее анализируют референтным методом, обычно методом ГЖХ.

Измерение светопоглощения на нескольких длинах волн с последующим расчетом содержаний компонентов по методу Фирордта не позволяет добиться необходимой точности. Очевидно, следует использовать *всю* информацию, заключенную в ИК-спектре пробы. Простейшим вариантом такого анализа является уже рассмотренный в этой книге метод ИИИ, с помощью которого по одномерным градуировкам отдельно определяют

алканы и арены [124]. Более сложные и более точные методы основаны на применении хеометрических алгоритмов, реализуемых с помощью компьютеров (разные варианты метода PLS, хеометрические алгоритмы МЛР, ГК и др.). В этом случае для определения показателей СГС чаще используют спектры поглощения не в средней (как при оценке содержания всех УВ), а в ближней ИК-области (БИК), т. е. в области 750–2500 нм. Метод малочувствителен, и в кювету прибора непосредственно помещают исследуемые нефтепродукты, а не их растворы. Оптические схемы БИК-анализаторов включают интерференционные светофильтры. Менее интенсивное поглощение по сравнению со средней ИК-областью позволяет существенно упростить конструкцию кювет, в том числе проточных.

В качестве примера на рис. 6.1 показан БИК-спектр одного из бензинов. Спектр представляется малоинформативным, но, тем не менее, по нему можно рассчитать набор показателей СГС в пересчете на любой стандарт или, лучше, на группу стандартов. Множество стандартов составляет «обучающую выборку». Образцы, по которым будет рассчитываться математическая модель,

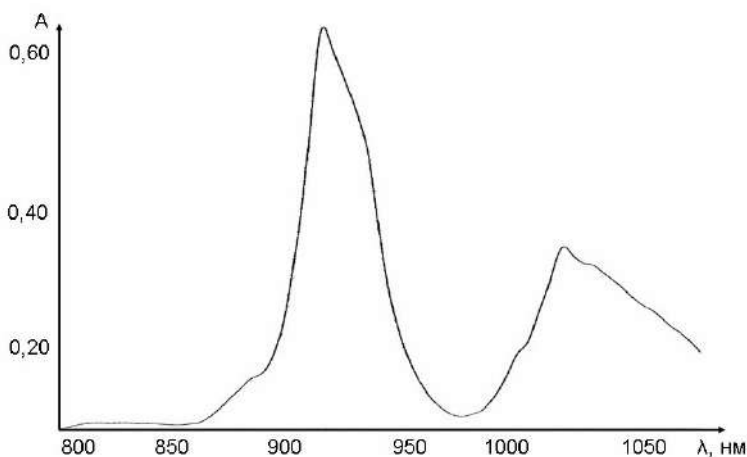


Рис. 6.1. БИК-спектр прямогонного бензина С-100

должны различаться по своему составу и свойствам, но все они должны быть похожи на будущие пробы. При этом диапазон изменения любой характеристики образцов (например, содержания аренов) должен включать в себя предполагаемые содержания аренов в будущих пробах. Данные о составе и свойствах образцов из обучающей выборки позволяют вычислить многомерные градуировочные функции, связывающие содержания компонентов и значения оптической плотности пробы на разных длинах волн. С помощью подходящей модели (многомерной градуировки) по БИК-спектру очередной пробы будут вычисляться ее показатели СГС.

Подобные методики появились сравнительно недавно, и они весьма перспективны для оценки качества технических нефтепродуктов. Так, фирма «Эшланд Петролиум» с помощью БИК-анализаторов определяет не только суммарные содержания олефинов и аренов в разных нефтепродуктах, но и октановые числа, давление паров, кривую разгонки. Однако стандартных методик нет, не ясны и метрологические характеристики такого варианта анализа. Исходя из литературных данных, можно сделать следующие выводы:

1. Разработка новых методик определения показателей СГС нефтепродуктов, в частности бензина, – актуальная проблема для нефтеперерабатывающей промышленности. Групповой анализ бензинов проводят в основном методом ГЖХ. Однако экспрессное определение показателей СГС этим методом невозможно. Кроме того, традиционный способ расчета показателей СГС по отдельным участкам хроматограммы, без учета более тяжелых компонентов той же пробы, может приводить к систематическим погрешностям анализа.

2. Определять показатели СГС можно методом БИК-спектрометрии. Из-за наложения полос поглощения углеводородов разного типа анализ требует применения многомерных градуировок. Стандартных методик структурно-группового анализа бензинов по БИК-спектрам нет. Разработка соответствующих моделей и методик представляется важной задачей. Выявление возможностей таких методик имеет и фундаментальное значение.

6.2.2. Построение математических моделей

Новые методики экспрессного структурно-группового анализа бензинов были разработаны сотрудниками кафедры аналитической химии ОмГУ и специалистами Омского нефтекомбината в ходе длительных совместных исследований. Заранее было решено не строить универсальную методику, пригодную для структурно-группового анализа любых бензинов, а получить набор более простых частных моделей для бензинов разного типа, например прямогонных, катализаторов и т. п. Такие модели легче строить и, вероятно, их применение должно обеспечить большую точность прогнозов.

Для получения многомерных градуировок необходимо, чтобы исходные данные отвечали нескольким условиям, в частности:

1. Между спектральными данными (вариациями спектра) и моделируемым свойством (например, показателем СГС) должна существовать достоверная корреляция.

2. Характер распределения случайных погрешностей исходных данных должен быть нормальным.

3. Различия в свойствах разных проб должны определяться систематически действующими факторами, а не случайными погрешностями измерений.

4. Неточность данных по некоторому образцу или даже группе образцов не должна оказывать существенного влияния на точность общей оценки моделируемого свойства во всем диапазоне его изменения.

При построении многомерных градуировок наиболее сложной задачей всегда является формирование представительной обучающей выборки. Ввиду нехватки стандартных образцов бензинов с аттестованными показателями структурно-группового состава, мы формировали выборки из БИК-спектров реальных проб бензина, произведенного в разное время на одной и той же установке. Показатели СГС этих проб определяли методом ГЖХ по стандартной методике [30]. Пробы бензина, произведенного в разные

дни, различались по составу и свойствам из-за изменчивости состава сырья, колебаний технологических параметров и т. п. Предполагалось, что состав и свойства проб, которые необходимо будет анализировать по разрабатываемой методике, будут примерно такими же, как у отобранных образцов.

В качестве примера рассмотрим построение многомерной градуировки для анализа прямогонных бензинов. Обучающая выборка содержала 87 проб прямогонной бензиновой фракции С-100, произведенной на установке КПА-85-140 Омского нефтекомбината при переработке однотипных нефтей парафино-нафтенового типа. Пробы отбирали в разные дни на протяжении целого года. Все пробы анализировали по стандартной методике [30] на хроматографе AUTOSYSTEM XL (Perkin Elmer). Хроматограф имел специальное программное обеспечение (программа Turbochrom 4.1), это позволяло вести компьютерную обработку хроматограмм и автоматически рассчитывать содержания индивидуальных углеводородов, а затем и суммарные содержания углеводородов каждого типа (показатели СГС). Выходящие пики опознавались путем автоматического сравнения индекса удерживания с индексами индивидуальных УВ из базы данных. Последняя была составлена производителем и периодически проверялась с помощью эталонных многокомпонентных смесей углеводородов. Для бензиновой фракции С-100 характерно около 120 пиков компонентов с температурой выхода до 145 °С, включая микропримеси. Массовая концентрация каждого компонента автоматически рассчитывалась методом нормализации с учетом коэффициентов чувствительности. Методика позволяла определять компоненты, начиная с 0,05 % масс.

По данным хроматографического анализа, образцы из обучающей выборки содержали от 40 до 55 % нафтендов, от 40 до 50 % парафинов, от 4 до 11 % аренов и не более 0,1 % олефинов. Проверка показала, что различия результатов анализа разных образцов нельзя объяснить случайными погрешностями анализа; коэффициенты вариации показателей СГС составляли 4–7 % и были

существенно больше, чем коэффициенты вариации при проведении повторных анализов одной пробы (0,1–0,3 %). Различия средних значений показателей СГС воспроизводятся при многократном повторении анализа и объясняются различным содержанием УВ данной группы в бензине, произведенном в разные дни. Тем не менее пробы, отобранные в разные дни с одной и той же установки, были слишком близки по составу. Поэтому в обучающую выборку включали и пробы, выходящие за пределы диапазона ожидаемых значений СГС. Такие пробы получали в момент запуска, сбоя в работе или при перезагрузке технологических установок.

БИК-спектры всех проб регистрировали на двухлучевом кварцевом спектрофотометре PIONIR-1024 фирмы Perkin Elmer в области 800–1080 нм при разрешении 0,3 нм. Время получения спектра – 15 с. Для каждого образца за это время было зарегистрировано по 200 сканов, с последующим усреднением. Источник излучения – галогеновая лампа накаливания, дисперсионный элемент – фиксированная голографическая решетка. Приемником служит матрица, составленная из 1024 высокочувствительных кремниевых фотодиодов. Сходимость повторно измеренных значений оптической плотности на любой длине волны характеризуется коэффициентом вариации 0,2–0,4 %. Разброс данных для образцов бензина, произведенного в разные дни, гораздо выше, $W = 2\text{--}7\%$. Следовательно, различия БИК-спектров образцов обучающей выборки нельзя объяснить случайными погрешностями.

Проверка закоррелированности характеристик светопоглощения и показателей СГС показала, что при некоторых длинах волн имеется статистически достоверная линейная корреляция. Таким образом, данная система отвечает всем теоретическим критериям, необходимым для создания адекватных многомерных градуировок.

Модель, создаваемая для прямогонного бензина, должна была учитывать содержание ароматических, нафтеновых и парафиновых углеводородов. Содержание олефинов в этом случае учитывать не надо, так как по хроматографическим данным их

содержание в прямогонных бензинах не превышает 0,10 %. При расчете других моделей (например, для анализа платформатов) содержание олефинов учитывалось. Не учитывали долю легкой и тяжелой ароматики, а также не выделяли группы парафиновых углеводородов разного строения. В принципе расчет детализированных показателей структурно-группового состава вполне возможен и даже целесообразен (для проведения соответствующих научных исследований). Однако по техническим условиям предприятия, регламентирующим процедуры аналитического контроля бензиновых фракций, контролируются только четыре вышеуказанных показателя СГС, без их детализации.

Для расчета моделей использовали стандартную программу QUANT+ версии 4.51 [187]. Это программное обеспечение, реализующее алгоритм PLS-1. Алгоритм позволяет рассчитывать функциональную связь между показателями состава образцов и их спектральными характеристиками, при наличии соответствующих корреляционных зависимостей. Вводили в компьютер номер образца, его показатели СГС (массовые доли аренов, парафинов и т. п.) и название файла с записью БИК-спектра этого образца.

Дальнейшие расчеты идут без прямого участия пользователя. В частности, компьютер проверял однородность выборки по статистическим критериям Махаланобиса (MD) и спектральных остатков (RR). Значения $MD > 1$ либо $RR > 3$ указывают на нехарактерный (несоответствующий используемой модели) состав образца либо на искажения БИК-спектра в ходе его регистрации. «Нехарактерный» или введенный с ошибкой образец отбраковывался. Указанные критерии используются и в дальнейшем, в ходе серийного анализа проб неизвестного состава. Они позволяют отбраковать нетипичные пробы, например бензины, полученные из нефти иного состава, по другой технологии, а также те образцы, у которых при регистрации ИК-спектров были допущены существенные ошибки. При вводе соответствующего спектра в компьютер пользователь получает сигнал: «Образец не соответствует модели. Повторите регистрацию спектра или используйте другую модель».

Полученные модели имели вид линейных регрессий. Алгоритм PLS-1 представляет каждый прогнозируемый показатель C_j как сумму некоторых спектральных *факторов* (X_i), умноженных на соответствующий *коэффициент* (K_i), т. е. рассчитываются и используются линейные регрессии вида

$$C_j = K_0 + K_1X_1 + K_2X_2 + \dots + K_iX_i + \dots + K_nX_n.$$

Набор таких регрессий по всем показателям служит моделью, описывающей состав бензинов данного типа. Факторы не имеют наглядного физического смысла, каждый из них представляет собой математическую функцию, аргумент которой – длина волны (λ), а положения пиков соответствуют длинам волн, особенно значимым при прогнозировании значений C_j . Значимость вклада разных факторов в ряду от K_0 до K_nX_n постепенно уменьшается. Так, в процессе создания модели прямогонного бензина для оценки содержания нафтенов программа выделила три значимых фактора. Первым фактором было описано 79,82 % вариаций спектра, вторым – 11,47 %, третьим – 6,97 %. Факторы более высокого порядка были автоматически отброшены программой, поскольку их влияние слишком мало (шумы). В других моделях значимыми были от 2 до 5 факторов. После завершения всех расчетов сформированная модель (уравнение многомерной регрессии) вводится в память спектрометра и в дальнейшем не уточняется. Всего было сформировано семь моделей – для разных типов бензина и разных вариантов анализа.

6.2.3. Результаты анализа бензинов с помощью многомерных градуировок

Количественное содержание каждой группы углеводов в анализируемой пробе рассчитывается по готовой модели после ввода файла с БИК-спектром пробы в компьютер, вычисления характеристик спектра и подстановки их в соответствующее уравнение регрессии. Вся процедура полностью автоматизирована. Выполнение серийных анализов не требует высокой квалификации аналитика. Время анализа очередной пробы не превышает 10 мин,

что в 20–25 раз меньше, чем требуется для анализа по стандартной ГЖХ-методике.

Проверку сформированных многомерных градуировок выполняли методом кросс-валидации. Образцы обучающего множества поочередно считали имеющими неизвестный состав, определяли его по соответствующей модели, а затем рассчитывали коэффициенты линейной корреляции между исходными и полученными значениями показателей (этот стандартный прием используют многие авторы). Найденные значения коэффициентов корреляции для большинства показателей оказались близки к единице. Среднеквадратичная ошибка калибровки для прямогонных бензинов не превышала 0,3 % абс. Количество положительных и отрицательных отклонений было приблизительно одинаковым.

Для окончательной проверки разработанных методик анализировали образцы, которые не использовались для создания моделей. Было проанализировано 37 таких проб. Часть результатов приведена в табл. 6.7 (десять проб выбраны случайным образом). Как правило, расхождения между результатами анализа единичных образцов по ГЖХ и БИК-методикам составляли 1–2 % отн. и почти никогда не превышали 3 % отн. Значительное отклонение – порядка 7 % – было обнаружено лишь для одной пробы. Погрешности меньше, чем допускаемые нормативами ASTM расхождения между результатами повторных анализов (8 % отн.) при определении тех же показателей по стандартной методике ASTM.

Другой способ проверки – расчет коэффициентов линейной корреляции между опорными и найденными значениями показателей СГС (рис. 6.2). Для прямогонных бензинов все коэффициенты превышали 0,97, т. е. корреляция была статистически значимой. Угловые коэффициенты аппроксимирующих прямых во всех случаях равны 1,0, что подтверждает отсутствие систематических расхождений.

Таблица 6.7

**Результаты анализа некоторых прямогонных бензинов
по стандартной (ГЖХ) и новой (БИК) методикам**

Проба	Нафтенy, % масс.			Парафины, % масс.			Арены, % масс.		
	X	БИК	Δ , %	X	БИК	Δ , %	X	БИК	Δ , %
1	48,03	48,08	0,1	43,27	43,34	0,2	8,69	8,52	-2,0
2	48,25	48,02	-0,5	42,71	43,02	0,7	9,04	8,82	-2,5
3	48,94	48,81	-0,3	43,70	43,85	0,3	7,34	7,48	1,9
4	48,61	47,80	-1,7	45,00	44,49	1,1	7,38	7,67	3,3
5	49,19	49,08	-0,2	43,58	43,68	0,2	7,23	7,37	1,9
6	49,72	49,79	0,1	41,92	41,63	-0,7	8,36	8,46	1,2
7	49,62	49,55	-0,1	42,23	42,52	0,7	8,15	8,05	-1,2
8	51,50	51,51	< 0,1	40,83	40,67	-0,4	7,66	7,81	1,9
9	51,61	51,55	-0,1	40,99	41,02	< 0,1	7,37	7,46	1,2
10	51,78	51,63	-0,3	42,09	41,97	-0,3	6,13	6,31	3,0

Примечание. $\Delta = 100 (\text{БИК} - X) / X$.

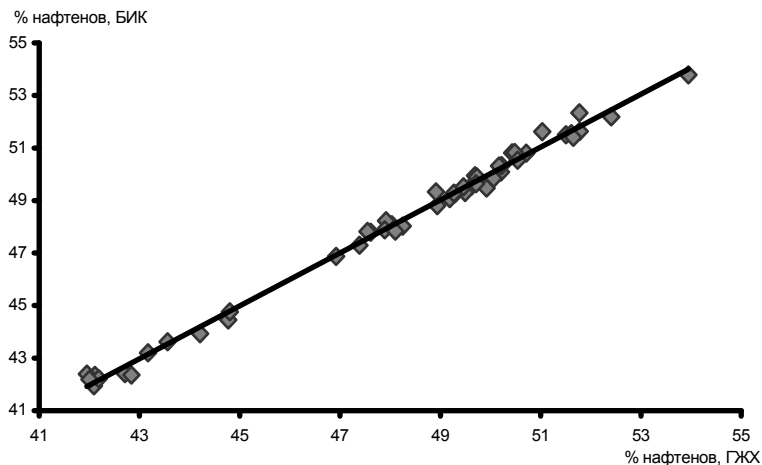


Рис. 6.2. Проверка адекватности модели для определения суммарного содержания нафтенyх углеводородов в прямогонных бензинах по многомерной градуировке

Дополнительная проверка показала, что использование разработанных методик для анализа бензинов, произведенного на других установках, но имеющего приблизительно такой же групповой состав, как пробы обучающего множества, не приводит к значимым систематическим погрешностям. Напротив, использование «модели прямогонного бензина» для анализа катализата иногда давало показатели СГС, в 2–3 раза отличающиеся от действительных. Таким образом, недостаток новой методики – ее узкоспецифический характер. Разработанную для одних бензинов методику нельзя использовать для анализа бензинов принципиально иного типа. В этом отношении преимущества ГЖХ очевидны, на одном и том же приборе можно анализировать любой бензин.

Основным преимуществом новой методики является ее экспрессность: по сравнению с методикой [30] время анализа уменьшается в 20 раз и составляет всего 10 мин. Это позволяет применить разработанную методику для текущего контроля и корректировки технологических процессов (в частности, процесса компаундирования бензиновых фракций). Стоимость анализа снижается, так как для новой методики не нужны дорогостоящие газы-носители (гелий). Для проведения анализа не нужна и высокая квалификация лаборанта, в его задачу входят лишь загрузка пробы в прибор, снятие данных с экрана компьютера и промывка кюветы. Разумеется, спектрометрическая методика определения обобщенных показателей СГС не может полностью заменить стандартную хроматографическую методику (источник данных для построения калибровочной модели), но может быть полезным дополнением к ней, экспрессным вариантом анализа бензина известного типа. Использование таких методик представляется перспективным и экономически целесообразным при стабильной технологии производства, четко определенной схеме аналитического контроля и большом числе анализируемых проб одинакового типа. Именно поэтому разработанные в ОмГУ модели и методики с 2005 г. успешно применяются в лабораториях технического контроля Омского нефтекомбината, они аттестованы предприятием и опубликованы [44].

6.3. Интервальные оценки суммарного содержания однотипных веществ

6.3.1. Взаимосвязь суммарных содержаний и обобщенных сигналов

Успешное применение многомерных градуировок для определения суммарного содержания однотипных веществ в различных объектах сложного состава подталкивает аналитиков к поиску новых способов обработки данных. Многомерные градуировки, рассмотренные в разделах 6.1 и 6.2, позволяют обработать совокупность сигналов, полученных при разных длинах волн (спектр пробы), используя множество стандартов известного состава. Возникает вопрос, нельзя ли использовать множество стандартов для обработки единичного сигнала (A_{Σ}), т. е. поглощения света однотипными аналитами при фиксированной длине волны? Математически задача формулируется так: *имеется m стандартов с известными значениями $(c_{\Sigma})_i$, для каждого из которых измерен обобщенный сигнал $(A_{\Sigma})_i$. Требуется найти все значения c_{Σ} , которым может соответствовать сигнал пробы $(A_{\Sigma})_x$ при той же методике формирования и измерения сигнала, что были использованы для стандартов.*

Решение задачи с помощью простейшей пропорции невозможно, так как между A_{Σ} и c_{Σ} нет прямо пропорциональной зависимости. При одном и том же значении c_{Σ} сигнал A_{Σ} может принять множество значений – как вследствие случайных погрешностей, так и вследствие произвольного выбора одного из возможных стандартов для подстановки его характеристик в пропорцию. Стандарты различаются по своему составу и, следовательно, по чувствительности определения веществ, формирующих сигнал. При использовании m разных стандартов в отсутствие случайных погрешностей измеренному значению $(A_{\Sigma})_x$ будут соответствовать разные значения $(c_{\Sigma})_x$. Все они должны войти в некоторый интервал значений c_{Σ} . Вычислить границы этого интервала в общем случае невозможно. Однако в некоторых частных случаях задача имеет вполне определенное решение.

Допустим, для каждого стандарта, представляющего собой индивидуальное вещество из некоторой группы однотипных веществ или некоторую смесь таких веществ, значения c_Σ и A_Σ прямо пропорциональны друг другу, т. е. $(A_\Sigma)_i = K_i \cdot c_\Sigma$. В условиях измерения сигналов значения K_i у разных стандартов различаются (внутригрупповая селективность) и могут быть определены в независимых экспериментах или теоретически рассчитаны с учетом состава стандартов.

После ранжирования выборки сопоставляемых стандартов можно выбрать стандарты с минимальным (K_1) и максимальным (K_m) значениями коэффициентов чувствительности. Это позволяет найти границы искомого интервала значений c_Σ , которым соответствует измеренное значение сигнала, в виде неравенства

$$A_\Sigma / K_m \leq c_\Sigma \leq A_\Sigma / K_1. \quad (6.4)$$

Из формулы (6.4) следует, что с помощью набора разных стандартов значение c_Σ может быть найдено даже по единственному значению сигнала. Однако оно может быть найдено только в виде некоторого интервала значений. Существенно, что интервальная оценка c_Σ по формуле (6.4) не требует вычисления интегрального показателя, выраженного в единицах концентрации стандарта, т. е. это метрологически корректная операция. Неопределенность интервальной оценки суммарного содержания однотипных веществ определяется двумя факторами – неопределенностью измеренного сигнала (случайные погрешности!) и неопределенностью коэффициентов чувствительности стандартных веществ. Изменение числа стандартов или замена одних стандартов другими приведут к другим интервальным оценкам. Поэтому выбор K_1 и K_m должен делаться с использованием большой и представительной выборки стандартных веществ, а в идеале – для генеральной совокупности, для всей группы однотипных веществ.

Подстановка $K_m = K_1 T$ в формулу (6.4) позволяет связать неопределенность интервальной оценки суммарного содержания (ширину интервала возможных значений) с величиной сигнала и внутригрупповой селективностью таких сигналов, а именно

$$\Delta c_{\Sigma} = (c_{\Sigma})_{\max} - (c_{\Sigma})_{\min} = A_{\Sigma} (T - 1) / K_1 T. \quad (6.5)$$

Из (6.5) видно, что неопределенность интервальной оценки исчезает, если все стандарты характеризуются одинаковой чувствительностью ($T = 1$). С другой стороны, неопределенность оценки c_{Σ} бесконечно велика, если в группу определяемых однотипных веществ входит хотя бы одно, которое по данной методике не определяется. В этом случае $K_1 = 0$, а деление на 0 приводит к бесконечно широкому интервалу значений c_{Σ} . В таких случаях интервальные оценки суммарных содержаний бессмысленны.

Естественно, формулы (6.4) и (6.5) учитывают только один источник неопределенности c_{Σ} – внутригрупповую селективность сигналов, и в реальных условиях могут не соблюдаться, например, из-за случайных погрешностей измерения сигналов или из-за влияния посторонних веществ. Тем не менее эти формулы представляют не только теоретический, но и практический интерес. Используя тот же подход, который был применен при выводе формулы (6.4), можно найти интервал значений c_{Σ} , соответствующий результату измерения любого интегрального показателя, т. е. оценить неопределенность этого показателя.

6.3.2. Расчет интервальных оценок по величине интегрального показателя [91]¹⁰

Способ интервальной оценки c_{Σ} следует выбирать в зависимости от того, какой фактор вызывает отклонения c^* от c_{Σ} . Если отклонения вызваны лишь случайными погрешностями измерений, следует использовать традиционные алгоритмы Лапласа или Стьюдента. Если же отклонения вызваны постоянно действующим фактором, и в общей неопределенности результатов анализа превалирует систематическая составляющая, оценка c_{Σ} требует разработки содержательных математических моделей. Отклонения c^* от c_{Σ} могут быть вызваны потерями аналитов в ходе пробоподготовки, неаддитивностью сигналов, влиянием посторонних веществ и други-

¹⁰ Подраздел подготовлен при участии Н.А. Исаченко.

ми факторами. Как показано в предыдущих разделах этой книги, основной причиной отклонений обычно является разная чувствительность определения веществ данной группы (включая разные $X_{\text{ст}}$). Разрабатываемая модель учитывает именно этот фактор.

Моделируя отклонения значения ИП (c^*) от c_{Σ} , мы приняли следующие допущения:

1. Группа определяемых веществ включает аналиты $X_1, X_2, X_3, \dots, X_m$, однотипные в структурном или функциональном отношении и участвующие в формировании обобщенного сигнала A_{Σ} . Концентрации индивидуальных аналитов в единичной пробе (c_i) неизвестны, некоторые c_i равны 0. Все c_i выражены в одних и тех же единицах.

2. Обобщенный сигнал A_{Σ} линейно зависит от концентрации каждого X_i , аддитивен и не создается другими компонентами пробы. Модель не учитывает матричные эффекты. В этом нет необходимости: интегральные показатели всегда определяют так, чтобы исключить или сильно снизить влияние матрицы.

3. Для всех X_i известны коэффициенты чувствительности K_i , причем $0 < K_1 \leq K_m$. Стандарт $X_{\text{ст}}$ принадлежит той же группе веществ и определяется по данной методике с известным коэффициентом чувствительности $K_{\text{ст}}$, причем $K_1 \leq K_{\text{ст}} \leq K_m$.

4. Погрешности, вызываемые всеми факторами, кроме различий в чувствительности определения аналитов по данной методике, пренебрежимо малы.

Формулы для расчета границ интервала возможных значений c_{Σ} можно вывести алгебраическим методом. Несложные, но громоздкие выкладки, аналогичные приведенным в предыдущем разделе, вначале привели нас к формуле:

$$c^* / T \leq c_{\Sigma} \leq c^* T. \quad (6.6)$$

Формула (6.6) применима при любых $X_{\text{ст}}$ [188], но рассчитанные с ее помощью интервалы оказываются слишком широкими даже при небольших T . Можно получить более точные оценки. Как уже отмечалось, приравнивание c^* и c_{Σ} ведет к появлению неопределенности (погрешности) δc , равной

$$\delta c = (c^* - c_{\Sigma}) / c_{\Sigma}, \quad (6.7)$$

откуда следует

$$c_{\Sigma} = \frac{c^*}{1 + \delta c}. \quad (6.8)$$

Как показано в работе [114], анализ смеси известного состава с применением ИП дает систематическую погрешность

$$\delta c = (K_{\text{ст}})^{-1} (\sum K_i R_i) - 1, \quad (6.9)$$

где R_i – доля X_i в смеси аналитов, присутствующих в данной пробе; суммирование ведется по всем этим аналитам.

Правильность формулы (6.9) подтверждена в экспериментах, проведенных с использованием разных смесей, разных стандартов и разных способов измерения сигнала. При фиксированном $K_{\text{ст}}$ погрешность δc может быть как отрицательной, так и положительной. Предельные значения положительной и отрицательной погрешности ($\delta c_{\text{max-}}$ и $\delta c_{\text{max+}}$) различны. Подстановка предельных значений δc в (6.8) дает очевидное неравенство:

$$\frac{c^*}{1 + \delta c_{\text{max+}}} \leq c_{\Sigma} \leq \frac{c^*}{1 + \delta c_{\text{max-}}}. \quad (6.10)$$

Формула (6.10) позволяет выразить $\delta c_{\text{max-}}$ и $\delta c_{\text{max+}}$ в явном виде. При любом заданном $K_{\text{ст}}$ верхний предел положительной погрешности достигается, если все X_i определяются с чувствительностью, максимально возможной для данной группы, т. е. все K_i равны K_m . Так как $\sum R_i = 1$, из (6.10) следует:

$$\delta c_{\text{max+}} = (K_{\text{ст}}^{-1} K_m \sum R_i) - 1 = (K_{\text{ст}}^{-1} K_m) - 1. \quad (6.11)$$

Максимальная по модулю отрицательная погрешность возникнет, если все аналиты пробы будут определяться с минимально возможной чувствительностью, т. е. все K_i окажутся равными K_l . В этом случае из уравнения (6.3) следует:

$$\delta c_{\text{max-}} = (K_{\text{ст}}^{-1} K_l \sum R_i) - 1 = (K_{\text{ст}}^{-1} K_l) - 1. \quad (6.12)$$

Подставляя выражения (6.5) и (6.6) в (6.4), получим искомую общую формулу, аналогичную ранее выведенной формуле (6.4):

$$\frac{c^* K_{\text{ст}}}{K_m} \leq c_{\Sigma} \leq \frac{c^* K_{\text{ст}}}{K_1}. \quad (6.13)$$

Отметим, что модель не допускает нулевых значений K_i , и применение формулы (6.13) не может привести к делению на ноль. Для удобства расчетов выразим K_m через T и введем новую переменную $Q = K_{\text{ст}} / K_1$:

$$\frac{c^* Q}{T} \leq c_{\Sigma} \leq c^* Q. \quad (6.14)$$

Из последнего выражения видно, что при фиксированном $X_{\text{ст}}$ интервал возможных значений c_{Σ} тем шире, чем больше T . Переход к неселективным методикам ($T \rightarrow 1$), уменьшает ширину этого интервала (ΔC), вплоть до нулевой. При этом c^* приближается к c_{Σ} .

Как показано в работе [114], оптимальный стандарт должен отвечать условию

$$K_{\text{ст}} \approx (K_1 + K_m) / 2.$$

В этом случае

$$Q = (T + 1) / 2. \quad (6.15)$$

Подстановка (6.15) в (6.14) приводит к неравенству

$$c^*(1 + T) / 2T \leq c_{\Sigma} \leq c^*(1 + T) / 2. \quad (6.16)$$

Формула (6.16) является частным случаем выражения (6.13). Она пригодна для любых групп аналитов, но лишь в рамках сделанных допущений и только при выполнении условия (6.15). Однако при выборе стандартов необходимо учитывать не только величину $K_{\text{ст}}$, но и другие критерии (см. раздел 5.4). Широко применяемые в практике стандарты обычно условию (6.15) не отвечают. Поэтому c_{Σ} следует оценивать по общим формулам (6.13) или (6.14). Подстановка $c^* = A_{\Sigma} / K_{\text{ст}}$ в (6.13) приводит к ранее выведенной общей формуле (6.4) для интервальной оценки суммарного содержания однотипных веществ без вычисления ИП.

Полученные формулы показывают, что, в отличие от интегральных показателей, интервальные оценки c_{Σ} полученные по значениям K_1 и K_m , имеют объективный характер, даже если они получены с помощью произвольно выбранного $X_{\text{ст}}$. Выраженный с помощью формул (6.4) или (6.13) результат анализа, выраженный в виде интервала возможных значений c_{Σ} , теоретически не зависит ни от выбора $X_{\text{ст}}$, ни от природы и соотношения концентраций аналитов, присутствующих в единичной пробе. Ширина этого интервала также не должна зависеть от выбора стандарта (см. формулу (6.5)). Конечно, в реальных условиях интервальные оценки, полученные для единичной пробы с помощью разных $X_{\text{ст}}$, могут несколько различаться из-за влияния случайных погрешностей. Тем не менее основной теоретический вывод – независимость интервальной оценки c_{Σ} от используемого при этом интегрального показателя – сохраняет свое значение. Это удалось подтвердить в эксперименте (подраздел 6.3.3).

6.3.3. Проверка выведенных формул

Методика эксперимента. Использовали три группы однотипных аналитов: А – антиоксиданты (в основном полифенолы); Б – углеводы (моно- и дисахариды); В – углеводороды (алканы, циклоалканы, алкиларены). Растворы готовили из реагентов квалификации х.ч. или ч.д.а. Модельные смеси содержали от 2 до 10 однотипных аналитов при соотношении концентраций, не превышающем 10:1. Растворитель – вода (А, Б) или тетрахлорметан (В). Было приготовлено свыше 100 смесей известного состава, различающихся по числу, набору и относительному содержанию компонентов. Методики измерения сигналов охарактеризованы в табл. 6.8. Как правило, одни и те же смеси анализировали по двум методикам. Так, содержание углеводов находили рефрактометрическим методом в пересчете на сахарозу или на галактозу, измеряя «исправленный» показатель преломления (Δn):

$$\Delta n = 10^3 (n_D - n_0),$$

где n_D – показатель преломления одно- или многокомпонентного водного раствора; n_0 – показатель преломления воды.

Таблица 6.8

Методики измерения обобщенных сигналов для разных групп однотипных аналитов

Группа	Аналиты	Прибор	Метод измерений	Условия измерений и ссылки	Область линейности и размерность c_i		$s, \%$	$X_{см}$
					0,2–20 мкмоль/л	0,5–40 мкмоль-экв/л		
А	Антиоксиданты: кверцетин, рутин, катехол, аскорбиновая кислота, галловая кислота, феруловая кислота, протокатеховая кислота	КФК-3-01	Спектрофотометрия	520 нм, рН 3.6, время экспозиции 10 или 60 мин [73]			< 3	АК, КВ и др.
Б	Углеводы: галактоза (ГА), сахароза (СХ), лактоза, фруктоза, манноза и др.	Рефрактометр Аббе	Рефрактометрия	Водные растворы [115]	5–50 г/л		< 3	СХ, ГА
В	Углеводороды: <i>n</i> -гексан, изооктан, <i>o</i> -ксилол, <i>n</i> -декан, толуол, кумол, циклопентан, циклогексан и др.	ФТ-801	Одноволновая ИК-спектрометрия	2930 см ⁻¹ [123]	5–200 мг/л		< 1	Смесь Симарда
			Многоволновая ИК-спектрометрия	2855, 2930, 2960, 3030 см ⁻¹ [101]	10–200 мг/л		< 2	

Сигналы некоторых смесей оказались неаддитивными, эти смеси в дальнейшем не использовались. В остальных случаях отклонения от аддитивности были статистически незначимы ($\alpha \leq 0,05$). Для каждой группы анализов строили веер из n линейных градуировок и рассчитывали параметр $T_{\text{эксп}}$, характеризующий внутригрупповую селективность методики. Затем анализировали модельные смеси, при этом значения c^* рассчитывали по градуировочной зависимости, построенной с помощью некоторого $X_{\text{ст}}$.

Интервальные оценки c_{Σ} получали по выведенным формулам, считая $T \approx T_{\text{эксп}}$. Границы интервалов округляли с учетом точности измерения сигнала, до двух или трех значащих цифр. Во всех случаях проверяли, попадает ли действительное значение c_{Σ} в интервал (6.13). Его ширину ΔC сопоставляли с шириной доверительного интервала, рассчитанного по Стьюденту по результатам трехкратных измерений ($P = 0,95$). Так же поступали, анализируя пищевые продукты или гидрохимические объекты.

Влияние выбора стандартного вещества. Коэффициенты чувствительности индивидуальных антиоксидантов при их спектрофотометрическом определении по методу FRAP достоверно различаются. При выражении c_i в мкмоль-экв/дм³ параметр $T_{\text{эксп}}$ при $n = 7$ составлял 1,5–2,1 ед. Результаты анализа трехкомпонентной смеси антиоксидантов, полученные с применением разных $X_{\text{ст}}$, показаны в табл. 6.9, из которой видно, что значения показателя АОА (c^*) зависят от выбора $X_{\text{ст}}$. Во всех случаях возникают статистически значимые погрешности, их знак и величина зависят от выбора $X_{\text{ст}}$.

Минимальный уровень погрешностей наблюдается при использовании АК, что отвечает рекомендациям специалистов, применяющих метод FRAP в анализе пищевых продуктов [149]. Хорошие результаты получали и с использованием кверцетина. Из табл. 6.9 видно, что интервальные оценки содержания антиоксидантов не зависят от выбора стандарта (в отличие от показателя АОА). Величина ΔC при переходе к другому $X_{\text{ст}}$ не изменяется, что соответствует вышеприведенным теоретическим выкладкам.

Другим примером могут быть результаты рефрактометрического определения углеводов (табл. 6.10).

Таблица 6.9

Интервальные оценки суммарного содержания антиоксидантов (мкмоль-экв/л) в единичной смеси, полученные с применением разных $X_{ст}$

$X_{ст}$	$K_{ст} 10^{-3}$	c^*	$\Delta c, \%$	Оценка c_{Σ} по выражению (6.13)	Δc_{Σ}
ФК	29,0	5,2	-35	5,2-10,8	5,6
ГК	23,6	6,4	-20	5,2-10,8	5,6
АК	20,4	7,5	-6	5,3-10,9	5,6
КТ	17,6	8,6	+8	5,2-10,8	5,6
КВ	17,0	8,9	+11	5,2-10,8	5,6
ПКК	17,0	9,0	+12	5,3-10,9	5,6
РТ	14,0	10,9	+36	5,3-10,9	5,6

Примечание. Состав смеси, мкмоль-экв/л: АК – 3,0; КТ – 3,0; ПКК – 2,0; $c_{\Sigma} = 8,0$. Время экспозиции (τ) – 10 мин; $T_{эксп} = 2,07$.

Таблица 6.10

Интервальные оценки суммарного содержания углеводов в модельных смесях, полученные с применением разных $X_{ст}$ и разных способов расчета

Смесь	$X_{ст}$	c^*	Формула (6.6)	Формула (6.13)	Формула (6.16)
1	СХ	43,8 ± 2,0	36–53	44–53	40–48
	ГА	48,2 ± 2,2	40–58	44–53	44–53
2	СХ	45,8 ± 2,9	38–55	46–56	42–51
	ГА	50,4 ± 3,2	42–61	46–56	46–56
3	СХ	44,5 ± 1,8	37–54	44–54	41–50
	ГА	49,0 ± 2,0	40–59	45–54	45–54

Примечание. Смеси 1–3 содержали сахарозу, глюкозу, лактозу, фруктозу и мальтозу, различаясь лишь соотношением компонентов. Для всех смесей $c_{\Sigma} = 50,0$ г/л; $T_{эксп} = 1,21$. Выделены жирным шрифтом интервалы, не включающие действительное значение c_{Σ} .

Коэффициенты чувствительности индивидуальных углеводов при их рефрактометрическом определении довольно близки – от 0,117 л/г для фруктозы и мальтозы до 0,142 л/г для сахарозы (СХ). Параметр $T_{\text{эксп}}$ при $n = 9$ равен 1,21. Условию (6.15) отвечают галактоза (ГА, $K_i = 0,130$) и ксилоза ($K_i = 0,129$). При рефрактометрическом определении углеводов результат обычно выражают в пересчете на сахарозу [168]. По нашим данным, такой выбор ведет к немного заниженным оценкам c_{Σ} . К более правильным результатам приводит пересчет сигнала на ГА, тогда c_{Σ} попадает в границы доверительного интервала, рассчитанного по Стьюденту.

Независимо от выбора $X_{\text{ст}}$, действительное значение c_{Σ} входит в интервалы (6.6) и (6.13), а при правильном выборе $X_{\text{ст}}$ – и в интервал (6.16). Ширина этих интервалов во всех случаях превышает ширину доверительного интервала, учитывающего только случайные погрешности измерений. Переход от СХ к ГА практически не сдвигает границы интервала (6.13) и не меняет его ширину, что подтверждает правильность выведенных формул.

Результаты анализа углеводородных смесей с применением разных $X_{\text{ст}}$ также подтвердили вывод о независимости интервальных оценок от субъективного выбора $X_{\text{ст}}$. Исключения мы наблюдали лишь при высоком уровне случайных погрешностей.

Влияние других факторов. При определении антиоксидантов полифенольного типа методом FRAP с использованием разных способов выражения их концентрации была подтверждена рекомендация о целесообразности выражения суммарного содержания антиоксидантов не в моль/л, а в моль-экв/л. Для выборки исследованных антиоксидантов значения $T_{\text{эксп}}$ равны 4,21 для молярных и 1,52 для «нормальных» концентраций. В обоих случаях действительное значение c_{Σ} входит в границы интервала, предписываемого формулой (6.13), но при выражении концентраций в моль-экв/л неопределенность была значительно ниже.

При определении углеводов методами ИК-спектроскопии был подтвержден ранее сделанный вывод о существенном снижении неопределенности оценки суммарного содержания УВ

при переходе от одноволновой к многоволновой ИК-спектрометрии. Примером может быть одна из многокомпонентных смесей УВ, в которой действительное значение c_{Σ} составляло 30,2 мг/л. Значения интегрального показателя, выраженные в пересчете на смесь Симарда и представленные в виде доверительных интервалов ($n = 3$, $P = 0,95$), несколько превышали действительное содержание УВ: метод одноволновой спектрометрии (2930 см^{-1}) дает $c^* = (40,6 \pm 0,8) \text{ мг/л}$, а метод многоволновой спектрометрии дает $c^* = (34,4 \pm 2,6) \text{ мг/л}$. Видно, что многоволновые измерения дают меньшую (по модулю) погрешность. Однако различие двух методов становится особенно заметным при вычислении интервальных оценок. При использовании одноволновой ИК-спектрометрии возможные значения c_{Σ} лежат в интервале (12–282) мг/л, а при использовании многоволновой ИК-спектрометрии – в интервале (28,1–34,8) мг/л. Действительное значение c_{Σ} входит в оба этих интервала.

По итогам проверки выведенных формул были сделаны следующие выводы:

1. Представление ИП в виде традиционных доверительных интервалов (по Стьюденту) при определении c_{Σ} не отражает действительную неопределенность результатов анализа и, как правило, ведет к недооценке неопределенности. Традиционный способ расчета доверительных интервалов учитывает лишь случайные погрешности. Предложенный алгоритм, учитывающий систематические погрешности, существенно дополняет традиционный расчет доверительных интервалов.

2. Интервальные оценки, рассчитанные по формуле (6.13), практически не зависят от выбора $X_{\text{ст}}$, а также от набора и соотношения аналитов в единичной пробе. Эти оценки объективно характеризуют неопределенность результатов анализа с учетом внутригрупповой селективности данной методики. Достаточно точные оценки суммарного содержания однотипных веществ возможны при $1 < T < 1,3$.

6.3.4. Интервальные оценки в анализе реальных объектов

Интервальные оценки суммарных содержаний были использованы в ходе анализа некоторых пищевых продуктов (алкогольные напитки, чай и т. п.) при определении суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP. Концентрацию антиоксидантов выражали в мкмоль-экв/дм³, в качестве стандартов использовали АК и КВ, условия анализа были предварительно оптимизированы. Интервальные оценки рассчитывали по формуле (6.13), принимая $T = 2,07$. Результаты анализа некоторых продуктов приведены в табл. 6.11.

Таблица 6.11

Результаты определения суммарного содержания антиоксидантов полифенольного типа в некоторых пищевых продуктах

Объект анализа	$X_{ст}$	c^* , ммоль-экв/л	Интервальные оценки c_{Σ} , ммоль-экв/л
Вино сухое красное Cruzares Vino Tinto	АК	17 ± 2	12–25
	КВ	20 ± 2	12–24
Вино сухое красное Campo Viejo Reserva	АК	22 ± 1	15–32
	КВ	26 ± 1	15–31
Коньяк «Три звездочки» российский трехлетний	АК	$1,2 \pm 0,1$	0,85–1,7
	КВ	$1,4 \pm 0,1$	0,82–1,7
Настойка чая «Высокогорный»	АК	$0,83 \pm 0,29$	0,58–1,2
	КВ	$1,0 \pm 0,3$	0,59–1,2

Следует обратить внимание на близость интервальных оценок, полученных для каждого объекта с применением разных $X_{ст}$. Очевидно, предлагаемый способ представления результатов анализа позволяет обобщать интервальные оценки, полученные для единичного объекта с применением разных стандартов, а также сравнивать результаты анализа с заранее принятыми нормативами. Поскольку интервальные оценки почти не зависят (с учетом ограничений модели) от индивидуального состава смесей, с помощью

этих оценок можно сопоставлять по суммарному содержанию антиоксидантов не только однотипные продукты (например, различные сухие красные вина), но и разнотипные объекты. Как уже отмечалось, сделать это с помощью «метод-зависимых» показателей АОА нельзя [68].

Интервальные оценки суммарных содержаний были апробированы и в гидрохимическом анализе. Интервальные оценки суммарного содержания фенолов в природных и сточных водах получали по результатам измерений в УФ области спектра, после отделения мешающих веществ и проведения фотометрической реакции с ДСК [25]. Для сравнения проводили анализ тех же проб независимыми методами. Однако интервальные оценки содержания фенолов хорошо согласуются с данными ВЭЖХ лишь для сточных вод. По-видимому, в анализе природных вод, содержащих гораздо меньшие количества фенолов, нельзя пренебречь случайными погрешностями и потерями фенолов в ходе пробоподготовки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований автор и его коллеги решали следующие задачи:

- систематизация сведений о способах определения суммарного содержания однотипных органических веществ без их разделения;

- выявление причин неточной оценки суммарного содержания этих веществ в пересчете на некоторое стандартное вещество;

- разработка общих подходов, обеспечивающих повышение точности соответствующих методик анализа, независимо от специфических особенностей изучаемой группы веществ;

- разработка новых методик анализа, а также практических рекомендаций для разработчиков методик и специалистов контрольно-аналитических лабораторий.

Перечисленные задачи в основном решены. Интегральные показатели удалось превратить из не вполне определенной и непредсказуемой характеристики гидрохимических объектов в инструмент точного определения суммарного содержания любых однотипных веществ. Стало понятно, как оптимизировать эти показатели, как подбирать стандартное вещество и сравнивать разные показатели. Выявлены способы снижения внутригрупповой селективности сигналов, что важно для повышения точности анализа. В спектрометрии этой цели проще всего достичь, применяя многоволновые измерения. Там, где это невозможно, задача решается с использованием множества стандартных веществ (многомерные градуировки).

Можно сформулировать основные выводы из проведенных исследований:

1. Интегральные показатели, получаемые в результате пересчета аналитического сигнала на концентрацию стандартного вещества, позволяют быстро, просто и, в ряде случаев, довольно точно оценить суммарное содержание однотипных аналитов. Такие показатели занимают видное место в системе показателей состава природных и техногенных объектов, наряду с характеристиками индивидуального состава. Применение интегральных показателей не следует считать вынужденным следствием отсутствия подходящих хроматографических или хеометрических методов анализа соответствующих объектов. По значению интегрального показателя можно точно охарактеризовать действительное значение суммарного содержания веществ соответствующей группы, но не в виде одного числа, а в виде интервала возможных значений.

2. Применяя «пересчетные» интегральные показатели, следует помнить о метрологической специфике этого способа оценки суммарных содержаний. В отличие от обычных результатов химического анализа, интегральные показатели зависят от выбора стандартного вещества, а также от способа и условий измерения сигнала; это субъективные, метод-зависимые характеристики состава объектов, обладающие особыми метрологическими свойствами (множественностью и многозначностью). Вводить нормативы химического состава объектов (например, ПДК), ориентированные на измерение «метод-зависимых» показателей, выраженных в пересчете на стандартное вещество, не следует.

3. Выявлены основные факторы, приводящие к неточным оценкам суммарного содержания однотипных веществ в виде интегральных показателей. Основным фактором во всех случаях является внутригрупповая селективность сигналов, дополнительными – неверный выбор стандартного вещества, неаддитивность сигналов и потери аналитов в ходе пробоподготовки. Доказана возможность и целесообразность нивелирования чувствительности определения однотипных аналитов, а также теоретически обоснованного подбора стандартных веществ. Влияние неаддитивности и потерь аналитов устраняется при одновременном ис-

пользовании множества стандартных веществ, т. е. при переходе от вычисления интегральных показателей к использованию многомерных градуировок.

Однако проведенные исследования позволили получить ответы далеко не на все ранее поставленные вопросы. Возникло также множество новых вопросов, и с их учетом можно наметить перспективные направления дальнейших исследований, а именно:

- **Развитие системы интервальных оценок**, характеризующих результат анализа с учетом систематических погрешностей. Такие оценки важны не только при определении суммарных содержаний, но и в других случаях, где не удастся снизить систематические погрешности до статистически незначимого уровня, в том числе при определении индивидуальных веществ. Пока что алгоритм расчета интервальных оценок удалось разработать лишь для одного механизма формирования систематических погрешностей (внутригрупповая селективность сигналов), но подобные алгоритмы хотелось бы создать и для других механизмов, например неаддитивности сигналов или спектральных наложений.

- **Подбор или разработка методик оценки суммарного содержания аналитов, оптимальных для каждой группы однотипных веществ и каждого типа объектов анализа.** В каких-то случаях это должны быть методики, основанные на применении интегральных показателей, в других случаях надо создавать многомерные градуировки. Наверняка есть и такие группы однотипных веществ, анализировать которые без разделения однотипных веществ вообще не следует.

- **Разработка новых методик анализа реальных объектов, основанных на применении многомерных градуировок.** Необходимо, чтобы такие градуировки стали более универсальными, менее чувствительными к качественному составу образцов, используемых для создания обучающей выборки, да и к качественному составу анализируемых проб.

- **Повышение чувствительности и межгрупповой селективности** при определении суммарных содержаний однотипных

веществ с помощью интегральных показателей и многомерных градуировок.

- В дополнение к разработанным нами способам нивелирования сигналов для спектрофотометрического анализа должны быть разработаны **способы нивелирования сигналов для электрохимических и других инструментальных методов анализа.**

- На базе выявленных теоретических закономерностей должны быть созданы **новые интегральные показатели.** В частности, нужны показатели, характеризующие суммарные содержания веществ, относящихся к сравнительно узким и внутренне однородным группам. Примерами могут быть полиарены, редуцирующие сахара, НАТ-антиоксиданты или катионные ПАВ. Напротив, внутренне неоднородные группы аналитов вообще не следует характеризовать интегральными показателями, поскольку не удастся найти сигналы, в формировании которых участвуют все компоненты группы ($T \rightarrow \infty$).

- **Теория интегральных показателей должна быть распространена на показатели 3-го и 4-го типа,** т. е. такие показатели, при вычислении которых стандартное вещество не относится к искомой группе веществ, принципиально отличаясь от компонентов группы.

Автор и его коллеги желают успеха всем, кто в дальнейшем будет работать в рамках сформированного нами научного направления, и приглашают их к совместным исследованиям в этой интересной области.

ЛИТЕРАТУРА

1. Власова И.В., Вершинин В.И., Цюпко Т.Г. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Проблема неаддитивности светопоглощения // Журнал аналитической химии. 2011. Т. 66, № 1. С. 24–33.
2. Baena J.R., Valcarcel M. Total indices in analytical sciences // Trends in analyt. chem. 2003. № 10. P. 641–649.
3. Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media / ed. W. Weisman. Amherst Sci. Publ., 1998. 98 p. (Total petroleum hydrocarbon criteria working group series. Vol. 1).
4. Объекты окружающей среды и их аналитический контроль. Кн. 1 / под ред. Т.Н. Шеховцовой. Краснодар: Арт-Офис, 2007. 348 с.
5. Пупкова В.И., Прасолова Л.М. Определение белка в моче и спинномозговой жидкости. Кольцово: Вектор Бест, 2007. 43 с. URL: <http://new.docme.ru/doc/318536>.
6. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека / Я.И. Яшин [и др.]. М.: Транслит, 2009. 212 с.
7. Снейт Дж.Г. Анализ нефти: справочник: пер. с англ. / под ред. Л.Г. Нехамкиной, Е.А. Новикова. СПб.: Профессия, 2010. 492 с.
8. Мерц В. Современные обобщенные показатели при мониторинге природных и сточных вод // Журнал аналитической химии. 1994. Т. 49, № 6. С. 557–566.
9. Золотов Ю.А. Определение интегральных показателей как задача аналитической химии // Журнал аналитической химии. 2004. Т. 59, № 7. С. 677.
10. Воронцов А.М. Обобщенные показатели в системе индексов качества природных сред: проблемы и перспективы // Экологическая химия. 2004. № 14. С. 1–10.
11. Дедков Ю.М. Современные проблемы аналитической химии сточных вод // Российский химический журнал. 2002. Т. XLVI, № 4. С. 11–17.

12. Кленкин А.А., Павленко Л.Ф., Темердашев З.А. Некоторые методические особенности определения уровня нефтяного загрязнения водных экосистем // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2007. Т. 73, № 2. С. 31–35.
13. Quansheng C., Jiewen Z., Muhua L. Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms // Journ. of Pharm. Biomed. Analysis. 2008. Vol. 46, № 3. P. 568–571.
14. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay / R. Apak [et al.] // Molecules. 2007. Vol. 19, № 7. P. 1496–1547.
15. Brereton R. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry // The Analyst. 2000. Vol. 125. P. 2125–2154.
16. Майстренко В.Н., Хамитов Р.З., Будников Г.К. Эколого-аналитический мониторинг суперэкоотоксикантов. М.: Химия, 1996. 320 с.
17. U.S. EPA Method 610 40 CFR part 136, App. A. National environmental methods, 2004.
18. Вершинин В.И. Органических веществ анализ // Большая российская энциклопедия. Т. 24. М.: БРЭ, 2014. С. 351–353.
19. Дюсембаева А.А., Вершинин В.И. Исследование процесса каталитического риформинга прямогонных бензинов с использованием структурных показателей состава // Химическая технология. 2005. № 12. С. 32–35.
20. Золотов Ю.А., Вершинин В.И. История и методология аналитической химии. М.: Academia, 2008. 464 с.
21. ГОСТ 51797-2001. Вода питьевая. Метод определения содержания нефтепродуктов. М.: Госиздат России, 2008. 15 с.
22. Идентификация нефтяных углеводородов при использовании различных методов анализа / И.А. Немировская [и др.] // Журнал аналитической химии. 1997. Т. 52, № 4. С. 392–396.
23. РД 52.24.480-2006. Массовая концентрация летучих фенолов в водах. Методика выполнения измерений ускоренным экстракционно-фотометрическим методом без отгонки. Утверждено Роскомгидрометом 20.12.2006.
24. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1975. 359 с.
25. К вопросу о точности спектрофотометрической оценки суммарного содержания фенолов / Т.В. Антонова [и др.] // Аналитика и контроль. 2012. Т. 16, № 4. С. 343–349.

26. Определение ряда фенолов в поверхностных и сточных водах методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием / Р.М. Хатмуллина [и др.] // Башкирский химический журнал. 2008. Т. 15, № 3. С. 48–52.
27. Достоверность и информативность показателя «фенольный индекс» / Л.В. Тропынина [и др.] // Методы оценки соответствия. 2012. № 12. С. 20–27.
28. Гагарина О.В. Оценка и нормирование качества природных вод: критерии, методы, существующие проблемы. Ижевск: Удмуртский университет, 2012. 199 с.
29. ASTM D 7066. Standard Test Method for dimer/trimer of chlorotrifluoroethylene (S-316) Recoverable oil and grease and nonpolar material by infrared determination. Annual book of ASTM standards. 2004.
30. ASTM D5134-98. Standard test method for detailed analysis of petroleum naphthas through n-Nonane by capillary gas chromatography. Annual book of ASTM standards. 1998.
31. Обзор хроматографических методов, используемых для определения нефтепродуктов в воде / М.Ю. Вожаева [и др.] // Вода: химия и экология. 2011. № 10. С. 34–40.
32. Капиллярный электрофорез / под ред. Л.А. Карцовой. М.: Наука, 2014. 444 с. (Проблемы аналитической химии. Т. 18).
33. Barwick V.J. Sources of uncertainty in gas chromatography and high-performance liquid chromatography // J. of Chromatography. A. 1999, Vol. 849. P. 13–33.
34. Друзов Ю.С., Зенкевич И.Г., Родин А.А. Газохроматографическая идентификация загрязнений воздуха, воды, почвы и биосред. М.: Бинном, 2005. 752 с.
35. Автоматизация процесса идентификации компонентов сложных смесей при совместном использовании индексов удерживания и индивидуальных отношений сигналов / Д.Ю. Полухин [и др.] // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 1999. Т. 65, № 3. С. 3–8.
36. Vershinin V.I. Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes. Review // Talanta. 2015. Vol. 131, № 1. P. 293–300.
37. EPA method 1664. Revision A. n-Hexane extractable material and silica gel treated n-hexane extractable material by extraction and gravimetry. EPA-821-R-98-002. 1999. 28 p.
38. Патент 2229122. Способ определения суммарного содержания углеводородов в анализируемой смеси. Оpubл. 20.05.2004. Бюл. № 14.

39. *Monakhova Y.B., Kuballa T., Lachenmeier D.W.* Rapid determination of total thujone in absinthe using ^1H -NMR spectroscopy // *International Journal of Spectroscopy*. 2011. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/171684>.
40. *Дедков Ю.М., Кельина С.Ю., Елизарова О.В.* Окисляемость как обобщенный показатель качества вод // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2000. Т. 66, № 1. С. 12–19.
41. *Власова И.В., Цюпко Т.Г., Шелпакова А.С.* Определение суммарного содержания антиоксидантов полифенольного типа по УФ-спектру поглощения смеси // *Методы и объекты химического анализа*. 2012. Т. 7, № 1. С. 19–25.
42. *Knothe G., Kenar J.A.* Determination of the fatty acid profile by ^1H -NMR spectroscopy // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2004. Vol. 106. P. 88–96.
43. *Cozzolino D., Kwiatkowski M., Parker M.* Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy // *Anal. Chim. Acta*. 2004. Vol. 513, № 1. P. 73–80.
44. *Вершинин В.И., Контева Е.В., Троицкий В.В.* Определение суммарных содержаний парафинов, нафтен и аренов по светопоглощению бензинов в ближней ИК-области // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2005. Т. 71, № 11. С. 10–15.
45. Determination of dissolved organic carbon in seawater using high temperature catalytic oxidation techniques / G. Spyres [et al.] // *Trends in Analyt. Chem.* 2000. Vol. 19, № 8. P. 498–506.
46. *Recklov D.A.* Analysis of total organic carbon. Amherst: University of Massachusetts, 2012. 32 p. URL: <http://www.ecs.umass.edu/eve/research/sop/TOC.pdf>.
47. *Зуев Б.К., Тимонина О.К., Подругина В.Д.* Экспрессный метод определения суммарного содержания органических примесей в воде // *Журнал аналитической химии*. 1995. Т. 50, № 6. С. 663–668.
48. Экспрессное определение химического потребления кислорода в воде с использованием высокотемпературных твердоэлектролитных ячеек / Б.К. Зуев [и др.] // *Журнал аналитической химии*. 2004. Т. 59, № 2. С. 185–189.
49. Определение концентрации нефтепродуктов и масел в пленках на поверхности воды / В.К. Зуев [et al.] // *Journal of Analyt. Chem.* 2001. Vol. 56, № 5. P. 481–484.
50. Патент 2224997. Вольтамперометрический способ определения активности антиоксидантов. Опубл. 27.02.2004. Бюл. № 6.

51. *Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Avramchik O.A.* Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltammetry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. Vol. 375, № 1-3. P. 465–468.
52. Патент РФ № 2005138705/22(043204). Анализатор для определения суммарной антиоксидантной активности объектов / Е.И. Короткова, В.И. Чернов, А.А. Бакибаев, А.Н. Мержа. Опубл. 12.12.2005.
53. Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation / Kh.Z. Brainina [et al.] // *Talanta*. 2007. Vol. 71, № 1. P. 13–18.
54. *Другов Ю.С., Родин А.А.* Экологический анализ при разливе нефти и нефтепродуктов. М.: БИНОМ, 2009. 270 с.
55. *Ming Yang.* Measurement of Oil in produced water // *Produced Water: Environmental risks and advances in mitigation technologies* / K. Lee, J. Neff (eds). N.Y.: Springer Science, 2011. P. 60–61.
56. *Бродский Е.С., Савчук С.А.* Определение нефтепродуктов в объектах окружающей среды // *Журнал аналитической химии*. 1998. Т. 53, № 12. С. 1238–1251.
57. Методы определения нефтепродуктов в водах и других объектах окружающей среды (обзор) / И.И. Леоненко [и др.] // *Методы и объекты химического анализа*. 2010. Т. 5, № 2. С. 58–72.
58. *Вершинин В.И., Антонова Т.В., Федорова М.А.* Надежность интегральных показателей как оценок суммарных содержаний углеводородов и фенолов в природных и сточных водах (обзор) // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2013. № 10. С. 3–12.
59. *Петров А.А.* Углеводороды нефти. М.: Наука, 1984. 369 с.
60. РД 52.10.243-92. Руководство по химическому анализу морских вод / под ред. С.Г. Орадовского. URL: <http://www.bestpravo.ru/rossijskoje/xd-gosudarstvo/mlg.htm>.
61. ISO/DIS 9377-4:1999. Water quality. Determination of hydrocarbon oil index. Part 4: Method using solvent extraction and gas chromatography.
62. ГОСТ 27384–2002. Вода. Нормы погрешности измерений показателей состава и свойств. Утверждено приказом Ростехрегулирования от 27.03.2008 № 64-ст. М., 2010. 10 с.
63. *Харлампович Г.Д., Чуркин Ю.В.* Фенолы. М.: Химия, 1974. 376 с.
64. *Воробьева Т.В., Терлецкая А.В., Кущевская Н.Ф.* Стандартные и унифицированные методы определения фенолов в природных и питьевых водах и основные направления их совершенствования // *Химия и технология воды*. 2007. Т. 29, № 4. С. 370–390.

65. Надежность показателя «фенольный индекс» / В.И. Вершинин [и др.] // Методы оценки соответствия. 2013. № 8. С. 22–26.
66. Патент РФ № 255 33322. Способ определения суммарного содержания фенолов в природных и сточных водах / Т.В. Антонова, В.И. Вершинин, Ю.В. Видимкина. Опубл. 20.11.2014. Бюл. № 24.
67. Будников Г.К., Зиятдинова Г.К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии // Журнал аналитической химии. 2005. Т. 60, № 7. С. 678–691.
68. Moon J.K., Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components // J. Agric. and Food Chem. 2009. Vol. 57, № 5. P. 1655–1666.
69. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide / M.H. Carlsen [et al.] // Nutritional Journal. 2010. Vol. 9, № 1. URL: <http://www.nutritionj.com/content/9/1/3> (дата обращения: 28.04.2011).
70. Roginsky V., Lissi E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food // Food chemistry. 2005. Vol. 92, № 2. P. 235–254.
71. Potayn M. Анализ пищевых продуктов. 1994. URL: www.twirpx.com/file/231883.
72. Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay // Anal. Biochem. 1996. Vol. 239, № 1. P. 70–76.
73. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP / Т.Г. Цюпко [и др.] // Аналитика и контроль. 2011. Т. 15, № 3. С. 287–298.
74. Huang D., Ou B., Prior R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays // J. Agric. Food Chem. 2005. Vol. 53, № 6. P. 1841–1856.
75. ГОСТ 15467-79. Управление качеством продукции. Основные понятия. Термины и определения. М.: Стандартинформ, 2009. 23 с.
76. Райзберг Б.А., Лозовский Л.Ш., Стародубцева Е.Б. Современный экономический словарь. М.: ИНФРА-М, 1999. 479 с.
77. Плитман С.И. Комплексная оценка самоочищающей способности водоемов // Гигиена и санитария. 1991. № 3. С. 15.
78. Орлов А.И. Проблемы управления экологической безопасностью. Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing, 2012. 344 с.
79. Лурье Ю.Ю. Методы анализа природных и сточных вод. М.: Наука, 1977. С. 14–20. (Проблемы аналитической химии, т. V).

80. СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения. М., 2002. 84 с.
81. *Никаноров А.М.* Научные основы мониторинга качества вод. СПб.: Гидрометеониздат, 2005. 575 с.
82. РД 52.24.643-2002. Метод комплексной оценки степени загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям. Ростов н/Д.: ГХИ, 2006. 21 с.
83. *Золотов Ю.А.* Новая парадигма аналитического контроля // *Экология и промышленность России*. 2006. № 3. С. 38–40.
84. International Vocabulary of Metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). 3rd ed. JCGM 200: 2008. P. 6.
85. *Вершинин В.И., Бриленок Н.С., Цюпко Т.Г.* Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Погрешность оценки суммарного содержания аналитов с учетом их коэффициентов чувствительности // *Журнал аналитической химии*. 2012. Т. 67, № 7. С. 715–720.
86. Способен ли метод определения белка в моче с пирогаллоловым красным претендовать на роль основного? / Е.С. Ларичева [и др.] // *Terra medica. Лаб. диагностика (обзоры)*. 2009. № 1 (21). С. 24–31.
87. ГОСТ 8.417-81. Единицы физических величин. М.: Стандартинформ, 2010. 28 с.
88. *Сергеев А.Г., Терегеря В.В.* Метрология, стандартизация, сертификация. М.: Юрайт, 2010. 820 с.
89. Идентификация фенолов в сточных водах нефтехимических предприятий Республики Башкортостан / Р.М. Хатмуллина [и др.] // *Естеств. и техн. науки*. 2013. Т. 64, № 2. С. 11–19.
90. Научные основы эколого-аналитического контроля промышленных сточных вод ЦБП / К.Г. Боголицын [и др.]. Екатеринбург: УРО РАН, 2010. 168 с.
91. *Вершинин В.И., Исаченко Н.А., Бриленок Н.С.* Методология анализа неразделенных смесей. Интервальные оценки суммарного содержания однотипных аналитов // *Журнал аналитической химии*. 2016. Т. 71, № 4. С. 369–376.
92. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. Руководство ЕВРАХИМ / СИТАК. 2-е изд. 2000. СПб.: ВНИИМ им. Д.И. Менделеева, 2002. 149 с.

93. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproin: CUPRAC method / R. Apak [et al.] // J. of agricultural and food chem. 2004. Vol. 52, № 6. P. 7970–7981.
94. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine, and ferricyanide reagents / K. Berker [et al.] // Talanta. 2007. Vol. 72, № 3. P. 1157–1165.
95. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent / K.I. Berker [et al.] // Food Analyt. Methods. 2010. Vol. 2, № 3. P. 1770–1778.
96. Яшин Я.И., Яшин А.Я. Проблема определения содержания антиоксидантов // Компетентность. 2009. № 8 (69). С. 52–53.
97. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 63–75.
98. Определение антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы Fe(III)/Fe(II) – органический реагент / З.А. Темердашев [и др.] // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2006. Т. 72, № 11. С. 15–19.
99. Infrared spectrometric determination of oil and phenol in water / R.G. Simard [et al.] // Anal. Chem. 1951. № 23. P. 1384–1389.
100. Щетникович К.А., Ованесов Е.Н., Овчинников И.М. Определение общего белка в моче – возможности, особенности и приборная часть // Лаборатория. 2007. № 4. С. 1–8.
101. Многоволновая ИК-спектроскопия как способ оценки суммарного содержания углеводов / С.В. Усова [и др.] // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19, № 1. С. 69–76.
102. Study on photocatalytic oxidation for determination of the low chemical oxygen demand using a nano-TiO₂-Ce(SO₄)₂ coexisted system / Chai Yi-hao [et al.] // Talanta. 2006. Vol. 68, № 3. P. 610–615.
103. ГОСТ 32139-2013. Нефть и нефтепродукты. Определение содержания серы методом энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии.
104. Benzie I.F., Szeto Y.T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing / antioxidant power assay // J. Agric. and Food Chem. 1999. Vol. 47, № 2. P. 633–636.
105. ГОСТ Р 52406-2005. Вода. Определение нефтепродуктов методом газовой хроматографии. М.: Стандартинформ, 2006. 19 с.

106. Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности: оценка основных метрологических характеристик / Е.Н. Шарафутдинова [и др.] // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2008. Т. 74, № 6. С. 9–14.
107. Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы на основе фенантролиновых комплексов железа / Т.Г. Цюпко [и др.] // Известия вузов. Пищевая промышленность. 2011. № 5. С. 84–87.
108. РД 52.24.476-2007. Массовая концентрация нефтепродуктов в водах. Методика выполнения измерений ИК-фотометрическим методом. Ростов н/Д.: Гидрохимический институт, 2007. 15 с.
109. *Зайцев В.М., Халаф В.А., Зайцева Г.М.* Методи концентрування та визначення фенольних сполук (огляд) // Методи та об'єкти хімічного експерименту. 2007. Т. 3, № 1. С. 14–21.
110. *Карцова Л.А., Алексеева А.В.* Влияние казеинов молока на содержание полифенольных соединений в чае // Журнал аналитической химии. 2008. Т. 63, № 11. С. 1211–1216.
111. *Ziyatdinova G., Nizamova A., Budnikov H.* Novel coulometric approach to evaluation of total free polyphenols in tea and coffee beverages in presence of milk proteins // Food Analytical Methods. 2011. Vol. 4, № 3. P. 334–340.
112. *Бриленок Н.С., Вершинин В.И., Бахарева М.В.* Оценка антиоксидантной активности полифенолов по методу FRAP в присутствии комплексантов // Аналитика и контроль. 2016. Т. 20, № 3. С. 209–217.
113. *Семенов А.Д., Страдомская А.Г., Павленко Л.Ф.* Количественное определение нефтепродуктов в водах // Методы анализа природных и сточных вод. Проблемы аналитической химии. М.: Наука, 1977. С. 203–221.
114. Методология анализа неразделенных смесей. Пределы погрешности при оценке суммарного содержания аналитов в пересчете на стандартное вещество / В.И. Вершинин [и др.] // Журнал аналитической химии. 2013. Т. 68, № 6. С. 535–543.
115. *Видимкина Ю.И., Казакова О.А., Вершинин В.И.* Рефрактометрическое определение суммарного содержания углеводов в пересчете на сахарозу // Вестник Омского университета. 2013. № 2. С. 108–111.
116. *Гомеля Н.Д., Калабина Л.В., Хохотва А.П.* Экстракционно-спектрофотометрический метод определения суммарного содержания неф-

- тепродуктов в воде // Химия и технология воды. 1999. Т. 21, № 6. С. 611–616.
117. ПНД Ф 14.1:2.4.128-98 (2002). Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природной, питьевой и сточной воды флуориметрическим методом на анализаторе жидкости “Флюорат-02”. НПФ “Люмекс”.
118. Методики определения нефтепродуктов и ПАУ в водах и донных отложениях: сб. метод. указаний. Ростов н/Д.: Изд-во НТПКАО ЭКСИДОН, 1992.
119. Патент РФ 2398004. Унифицированная смесь углеводов для определения нефтепродуктов инфракрасным и люминесцентным методами / Л.Ф. Павленко, А.А. Ларин. Опубл.: 27.08.2010. Бюл. № 24.
120. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assays: A Comparative Study / B. Ou [et al.] // J. Agric. Food Chem. 2002. Vol. 50. P. 3122–3128.
121. *Hastings S.H., Watson A.T., Williams R.A.* Determination of hydrocarbon functional groups by infrared spectroscopy // *Analyt. Chem.* 1952. Vol. 24, № 4. P. 612–616.
122. *Большаков Г.Ф.* Инфракрасные спектры насыщенных углеводов. Ч. 1: Алканы. Новосибирск: Наука, 1986. 177 с.
123. *Федорова М.А., Усова С.В., Вершинин В.И.* Точность ИК-спектрометрического определения суммарного содержания углеводов при разных способах измерения аналитического сигнала // *Аналитика и контроль.* 2014. Т. 18, № 1. С. 91–98.
124. Определение нефтепродуктов в водах на основе ИК-Фурье спектрального комплекса и измерения интегральных интенсивностей полос поглощения / Р.Р. Шагидуллин [и др.] // *Журнал аналитической химии.* 2002. Т. 57, № 3. С. 250–256.
125. *Хранко Н.В.* Определение интегральной антиоксидантной способности растительного сырья и пищевых продуктов: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Краснодар, 2006.
126. *Zaia D.A.M., Marques F.R., Zaia C.T.* Spectrophotometric determination of total proteins in blood plasma: a comparative study among dye-binding methods // *Braz. arch. biol. technol.* 2005. Vol. 48, № 3. P. 385–388.
127. *Усова С.В., Федорова М.А., Вершинин В.И.* Прогнозирование коэффициентов поглощения и систематических погрешностей при ИК-

- фотометрическом определении суммарного содержания углеводов в природных и сточных водах // Методы и объекты химического анализа. 2013. Т. 8, № 4. С. 186–193.
128. *Вершинин В.И.* Априорная оценка погрешности определения суммарного содержания аналитов с учетом индивидуальных коэффициентов чувствительности // Вестник Омского университета. 2011. № 2. С. 113–119.
129. *Власова И.В., Шилова А.В.* Новые подходы к спектрофотометрическому анализу многокомпонентных смесей // Вісник Харківського національного університету. 2007. Хімія. Т. 15 (38), № 770. С. 141–146.
130. *Вершинин В.И., Власова И.В., Цюпко Т.Г.* Выявление отклонений от аддитивности в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей // Методы и объекты химического анализа. 2010. Т. 5, № 4. С. 226–234.
131. *Кулешова М.П., Вершинин В.И.* Погрешность кондуктометрической оценки суммарного содержания сильных электролитов в пересчете на стандартное вещество // Вестник Омского университета. 2012. № 2. С. 113–117.
132. *Лурье Ю.Ю.* Справочник по аналитической химии. М., 1988. 448 с.
133. *Бабко А.К., Пилипенко А.Т.* Фотометрический анализ. Общие сведения и аппаратура. М.: Химия, 1968. С. 62.
134. *Васильев А.Ф.* Новые возможности анализа многокомпонентных смесей по спектрам поглощения // Применение ЭВМ в химических и биохимических исследованиях. М.: Химия, 1976. С. 246.
135. *Лен Ж.М.* Супрамолекулярная химия. Концепции и перспективы. Новосибирск: Наука, 1998. 334 с.
136. *Берштейн И.Я., Каминский Ю.А.* Спектрофотометрический анализ в органической химии. Л.: Химия, 1986. 200 с.
137. *Khots M.S., Nazarov V.I., Lyovin A.A.* Statistical analysis of non-additivity in spectra of multicomponent mixture // Chemometrics and Intel. Lab. Systems. 1993. № 18. P. 281–284.
138. Аддитивна ли оптическая плотность смесей в ИК-области? / С.В. Усова [и др.] // Аналитика и контроль. 2011. № 1. С. 78–84.
139. *Масякова Е.Н.* Спектрофотометрический анализ смесей водорастворимых витаминов с применением хемометрических алгоритмов: дис. ... канд. хим. наук. Томск: ТПУ, 2009.
140. *Власова И.В., Вершинин В.И.* Возможность определения компонентов бинарных смесей методом Фирордта с погрешностями, не пре-

- вышающими заданный предел // Журнал аналитической химии. 2009. Т. 64, № 6. С. 571–576.
141. *Власова И.В., Шелпакова А.С., Вершинин В.И.* Спектрофотометрический анализ неразделенных смесей органических веществ с применением метода PLS // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2011. Т. 75. № 4. С. 19–22.
142. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Применение статистических моделей / В.И. Вершинин [и др.] // Журнал аналитической химии. 2011. Т. 66, № 7. С. 708–715.
143. *Кац М.Ф.* О количественной оценке степени неаддитивности при анализе многокомпонентных смесей по спектрам поглощения // Журнал прикладной спектроскопии. 1973. Т. 43, № 1. С. 151–152.
144. *Сагайдачный С.Н., Солдатов В.Н.* Проверка аддитивности многокомпонентных смесей методом корреляционного анализа // Журнал аналитической химии. 1986. Т. 41, № 2. С. 224–226.
145. *Пустыльник Е.И.* Статистические методы анализа и обработки наблюдений. М.: Наука, 1968. С. 142–144.
146. *Темердашев З.А., Цюпко Т.Г.* Проблемы и аналитические решения при определении антиоксидантной активности пищевых продуктов // Аналитика России – 2009: материалы III Всерос. конф. Краснодар: КубГУ, 2009. С. 428.
147. *Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В.* Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М.: Наука, 1976. 279 с.
148. *Вершинин В.И., Перцев Н.В.* Планирование и математическая обработка результатов химического эксперимента. Омск: ОмГУ, 2005. 215 с.
149. МУ 08-47/275. МВИ «Спектрофотометрический метод измерений антиоксидантной активности пищевых продуктов». 2010. Томский политехнический университет. Зарегистрировано в Федеральном реестре МВИ. ФР 1.31.2011.019197.
150. *Niebergall P.J., Mattocks A.M.* A note on the use of multiple regression for spectrophotometric assays involving more than one component // Drug Standards. 1960. Vol. 23. № 3. P. 61–66.
151. *Vershinin V.I., Petrov S.V.* The estimation of total petroleum hydrocarbons in waste waters by multiwave IR spectrometry with multivariate calibrations // Talanta. 2016. Vol. 148, № 1. P. 163–169.

152. DIN 38409-H18. Bestimmung von Kohlenwasserstoffen. Ausgabe 02-1981.
153. Nederlandse norm NEN 6675. Determination of mineral oil content by infrared spectrometry. October 1989.
154. Influence of protein composition on total urinary protein determined by Pyrocatechol-Violet and Pyrogallol red dye binding methods / G. Lefevre [et al.] // J. Clin. Lab. Anal. 2001. Vol. 15. P. 40–42.
155. Определение суммарного содержания тиолов методом инверсионной вольтамперометрии / И.Е. Стась [и др.] // Химия растительного сырья. 1997. Т. 1, № 3. С. 35–42.
156. ASTM D1783–01 (2007). Standard Test Methods for Phenolic Compounds in Water.
157. *Сиггва С., Ханна Дж.* Количественный органический анализ по функциональным группам. М.: Химия, 1983. 672 с.
158. *Лурье Ю.Ю.* Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: Химия, 1984. 448 с.
159. *Черноусов Ю.И., Иванов Н.А., Пилякин В.Н.* Органические вещества сточных вод сульфатно-целлюлозного производства. III. Фенолы // Химия древесины. 1975. № 2. С. 105–111.
160. *Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F.* Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified FRAP assay // J. Agric. and Food Chem. 2000. Vol. 48, № 8. P. 3396–3402.
161. Определение антиоксидантной активности сухих красных вин для оценки их качества / Т.Г. Цюпко [и др.] // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2008. Т. 74, № 11. С. 14–17.
162. Патент РФ 2 391 660. Способ определения интегральной антиоксидантной активности с использованием полиметакрилатной матрицы / Н.А. Гавриленко, Н.В. Саранчина. Оpubл.: 10.06.2010. Бюл. № 16.
163. An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein / J.L. Orsonneau [et al.] // Clin. Chem. 1989. Vol. 35, № 11. P. 2233–2236.
164. Интерпретированные колебательные спектры углеводов – производных циклогексана и цикlopентана / М.Э. Эляшберг и др. М.: Наука, 1988. 375 с.
165. Патент РФ 2117933. Способ количественного определения нефтяных углеводов с использованием численного поддиапазонного интегрирования ИК-спектров / С.С. Волкова [и др.]. Оpubл. 20.08.1998. Бюл. № 17.

166. Количественное определение углеводов с использованием численного поддиапазонного интегрирования инфракрасных спектров / С.С. Волкова [и др.] // Журнал прикладной химии. 1997. Т. 70, № 5. С. 807–811.
167. Зиятдинова Г.К. Гальваностатическая кулонометрия в анализе природных полифенолов и ее применение в фармации // Журнал аналитической химии. 2010. Т. 65, № 11. С. 1202–1206.
168. Патент РФ 2422819. Способ рефрактометрического экспресс-определения содержания сахаров в плодах груши / Н.А. Разумников, Р.И. Винокурова, О.М. Конюхова. Оpubл. 10.08.2010. Бюл. № 22.
169. Nenadis N., Lazaridou O., Tsimidou M.Z. Use of reference compounds in antioxidant activity assessment // J. agric. and food chem. 2007. Vol. 55, № 14. P. 5452–5458.
170. Модельная смесь углеводов для ИК-спектрофотометрии и флуориметрии нефтепродуктов / А.А. Кудрявцев [и др.] // Вестник ТЮмГУ. 2011. № 5. С. 63–70.
171. Патент РФ 2282851. Способ определения суммарной антиоксидантной активности / Т.Г. Цюпко [и др.]. Оpubл. 27.08.2006. Бюл. № 24.
172. ПНД Ф 14.1:2.105-97. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений суммарных содержаний летучих фенолов в пробах природных и очищенных сточных вод экстракционно-фотометрическим методом после отгонки с паром.
173. ПНД Ф 14.1:2.4.170-2000(2006). Методика выполнения измерений массовой концентрации фенола в питьевых, природных и сточных водах методом жидкостной хроматографии. Дзержинск: Региональный центр экологического мониторинга, 2000. 18 с.
174. Математические методы и ЭВМ в аналитической химии: сб. науч. тр. / отв. ред. Л.А. Грибов. М.: Наука, 1989. 300 с.
175. Родионова О.Е., Померанцев А.Л. Хемометрика в аналитической химии. 2006. URL: http://www.chemometrics.ru/materials/articles/chemometrics_review.pdf.
176. Вершинин В.И. Хемометрика в работах российских аналитиков (обзор) // Журнал аналитической химии. 2011. Т. 66, № 11. С. 1124–1134.
177. Tasting of beverages using an electronic tongue / A.V. Legin [et al.] // Sensors and Actuators, B. 1997. Vol. 44, № 1-3. P. 291–296.

178. Chemometrics-assisted spectrophotometric method for simultaneous determination of vitamins in complex mixtures / Yu.B. Monakhova [et al.] // *Analyt. Bioanal. Chem.* 2010. Vol. 397, № 3. P. 1297–1306.
179. Власова И.В. Спектрофотометрический анализ неразделенных смесей (лекарственных и витаминных препаратов) с применением хемометрических алгоритмов: автореф. дис. ... д-ра хим. наук. Томск, 2011. 48 с.
180. *Esbensen K.H. Multivariate Data Analysis – In Practice.* Oslo: CAMO, 2004. 589 p.
181. The UNSCRAMBLER. URL: <http://www.camo.com/rt/Products/Unscrambler/unscrambler.html> (дата обращения: 03.11.2014).
182. Филатов В.М., Сафиева Р.З. Хемометрические методы анализа продукции нефтепереработки и нефтехимии // *Нефтепереработка и нефтехимия.* 2019. № 9. С. 33–38.
183. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Титова А.П. Метод ближней ИК-спектроскопии в системе контроля качества лекарственных средств (обзор) // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2010. № 1. С. 16–20.
184. Оценка суммарного содержания углеводов в неразделенных смесях с помощью многомерных градуировок / В.И. Вершинин [и др.] // *Вестник Омского университета.* 2015. № 3. С. 36–41.
185. Бегак О.Ю., Сыроежко А.М. О совершенствовании нормативной базы аналитических методов для контроля качества бензинов // *Химия и переработка нефти и газа.* 2001. № 1. С. 37–38.
186. Вершинин В.И., Дерендяев Б.Г., Лебедев К.С. Компьютерная идентификация органических соединений. М.: Академкнига, 2002. 197 с.
187. Spectrum QUANT+. Руководство пользователя / Perkin-Elmer LLC. Beaconsfield, Buckinghamshire, England, 1999.
188. Вершинин В.И., Исаченко Н.А. Интервальные оценки суммарных содержаний однотипных аналитов // *Вестник Омского университета.* 2012. № 4. С. 96–101.

Научное издание

Вершинин Вячеслав Исаакович

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ
ОДНОТИПНЫХ ВЕЩЕСТВ
(ТЕОРИЯ ИНТЕГРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ)**

Монография

Редактор *Д.С. Нерозник*

Технический редактор *М.В. Быкова*

Дизайн обложки *З.Н. Образова*

Подписано в печать 29.11.2016. Формат бумаги 60х84 1/16.

Печ. л. 18,0. Усл. печ. л. 16,7. Уч.-изд. л. 15,3. Тираж 100 экз. Заказ 168.

Издательство Омского государственного университета

644077, Омск, пр. Мира, 55а

Отпечатано на полиграфической базе ОмГУ

644077, Омск, пр. Мира, 55а