Выявление отклонений от аддитивности в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей

В.И. Вершинин,[1] И.В. Власова,[1] Т.Г. Цюпко[2]

[1] Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского. Россия, 644077, г. Омск, пр.Мира, 55[a]. E-mail *vyvershinin@yandex.ru*

[2] Кубанский государственный университет. Россия, 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149. E-mail *tsypko@inbox.ru*

Поступила: 20 июля 2010 г. / Подписана к печати: 12 октября 2010 г.

Отклонения от аддитивности светопоглощения (ОА), связанные с взаимодействием компонентов пробы, приводят к систематическим погрешностям и должны учитываться при разработке новых методик спектрофотометрического анализа. Разработаны три способа выявления статистически значимых ОА на фоне случайных погрешностей. Наиболее информативный способ – расчет статистических моделей - позволяет прогнозировать ОА и выявлять взаимодействующие компоненты. В качестве примера показана необходимость учета ОА для оптимизации методики определения суммарного содержания антиоксидантов.

V.I. VERSHININ, I.V. VLASOVA, T.G. TSYPKO. EXPOSURE OF DEVIATIONS FROM ADDITIVITY IN THE SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF UNSEPERATED MIXTURES - The deviations from additivity of absorbtion (DA), connected with the interaction of sample components, lead to systematic errors of analysis. It is necessary to take DA into account when new spectrophotometric methods are developed. Three modes of DA exposure are elaborated to distinguish the statistically significant deviations from the accidental errors. The statistical model calculation is most informative mode, which allows deviations forecasting and the interactive components detecting. As an example, the necessity of DA investigation is demonstrated for total antioxidant determination.

Ключевые слова: спектрофотометрический анализ, аддитивность светопоглощения, отклонение от аддитивности, систематические погрешности анализа, способы выявления отклонений

Key words: spectrophotometric analysis, additivity of absorbtion, deviations from additivity, systematic errors of analysis, modes of deviations exposure.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что реакции между растворенными веществами ведут к неаддитивности светопоглощения раствора. При этом оптическая плотность смеси (A_{Σ}) становится достоверно отличающейся от суммы оптических плотностей ($\sum A$) компонентов, измеренных в тех же условиях порознь [1]. В литературе не раз отмечались отклонения от аддитивности светопоглощения (ОА) смесей органических веществ (лекарственные препараты, нефтепродукты, антиоксиданты, пестициды и т.д.) [2]. Точность анализа смесей падает по мере роста ОА [3], что надо учитывать при разработке методик спектрофотометрического анализа, в частности, основанных на применении хемометрических алгоритмов [4]. С другой стороны, исследование ОА может быть эффективным способом изучения механизма фотометрических реакций и других процессов в растворах [5].

Систематических исследований в этой области аналитики не проводили. Нет даже общепринятых способов выявления статистически значимых ОА, позволяющих отличить их от переменных по знаку и нестабильных по величине «отклонений», вызванных случайными погрешностями приготовления растворов и оптических измерений. Сделать это не так просто: нужна статистическая обработка данных, полученных при многократном приготовлении и фотометрировании растворов, с последующей оценкой значимости некоторой нуль-гипотезы. *Цель данной работы* - разработка способов выявления отклонений от неаддитивности светопоглощения, более обоснованных и информативных, чем известные способы [6-8]. Такие способы должны быть применимы для смесей любого состава и с любым числом компонентов, независимо от использования той или иной области спектра или от причин неаддитивности.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ

Отклонения от аддитивности выражают в единицах оптической плотности (ΔA) или в % (δA):

$$\Delta A = A_{\Sigma} - \sum A, \qquad (1)$$

$$\delta A = 100\ \% \ \Delta A \ / \ \sum A. \qquad (2)$$

© В.И. Вершинин, И.В. Власова, Т.Г. Цюпко

Оценивая $\sum A$, учитывают только исходные компоненты смеси, а не продукты их взаимодействия [9], поскольку продукты (например, молекулярные ассоциаты) нередко образуются с низким выходом, неустойчивы, а их спектры поглощения неизвестны. Не учитывают и снижения концентраций исходных компонентов при их взаимодействии. Поэтому в случае выполнения закона Бугера-Ламберта-Бера величина кажущегося отклонения от аддитивности при l = 1 см и λ = Const равна:

$$\Delta A = A_{\sum} - \sum \varepsilon_i c_i , \qquad (3)$$

где ε_i - молярный коэффициент светопоглощения, а c_i - начальная концентрация (моль/л) i-го компонента или его деривата.

Очевидно, проверить аддитивность светопоглощения смеси при λ = Const можно тремя принципиально разными способами:

1) при неизменном составе исследуемой смеси;

2) при варьировании содержания одного из компонентов;

3) при одновременном варьировании содержаний ряда или всех компонентов.

Заметим, что величина ОА зависит не только от природы исследуемой системы и длины волны, но и от соотношения концентраций компонентов [7]. Поэтому третий способ дает гораздо больше полезной информации, чем второй и особенно первый, но он более сложен и трудоемок.

Рассмотрим эти способы по очереди.

Первый способ основан на применении стандартной процедуры сравнения средних значений двух выборок по Стьюденту [10], но в известной нам литературе по спектрофотометрическому анализу он не описан. Для реализации этого способа готовят растворы компонентов исследуемой смеси, а именно: m растворов вещества X_1 с концентрацией c_1, m растворов X_2 с концентрацией c_2, и т.д. Затем в одинаковых условиях измеряют светопоглощение всех растворов, получая матрицу результатов, содержащую m столбцов и n строк. Строки характеризуют растворы одного вещества, столбцы - растворы разных веществ. Грубые промахи отсутствуют или заранее исключены.

$$\begin{array}{l} A_{11},\ A_{12},\ \ldots..\ A_{1j}\ ,\ \ldots..A_{1m}; \\ A_{21},\ A_{22,}\ \ldots.\ A_{2j}\ ,\ldots..\ A_{2m}; \\ \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \\ A_{n1},\ A_{n2},\ \ldots\ \ A_{nj},\ \ldots..\ A_{nm}. \end{array} \qquad (4)$$

Во всех случаях используют один и тот же растворитель, спектрофотометр, раствор сравнения. Приготовление и фотометрирование каждого раствора рассматривают как единую операцию, независимую от приготовления и фотометрирования остальных растворов и отягощенную нормально распределенными погрешностями. Суммируют результаты измерений по столбцам, получая первую выборку, содержащую m значений новой случайной величины $y_j = \sum A_{ij}$. Ее среднее значение - $\sum A$, а дисперсия – S^2_1. Затем готовят m одинаковых смесей, то есть 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 вариант.

$$A_{\sum 1}\ ,\ A_{\sum 2}\ ,\ \ldots..\ A_{\sum q},\ \ldots.\ ,\ A_{\sum m}\ . \qquad (5)$$

Ее среднее значение - $A_{\sum}$, а дисперсия - S^2_2.

Если отношение дисперсий S^2_1 и S^2_2 не превысит табличного значения критерия Фишера (Φ) для выбранного критического уровня значимости (например, для α = 0,01), средние значения двух полученных выборок можно сопоставлять по Стьюденту. Нуль-гипотеза в этом случае – равенство математических ожиданий μ_1 и μ_2, то есть принадлежность обеих выборок одной и той же генеральной совокупности. Нуль-гипотеза опровергается на уровне значимости α = 0,01, если:

$$t_{эксп} = | A_{\sum} - \sum A | / S_d \ > \ t_{0,01}. \qquad (6)$$

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

$$S_d = \sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{m}}\ . \qquad (7)$$

При неоднородности дисперсий S^2_1 и S^2_2 статистическое сравнение средних следует проводить несколько более сложным способом [11], однако неоднородность дисперсий при малых m представляется маловероятным событием.

Пример 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 углеводорода в тех же концентрациях, - 0,74, 0,77 и 0,71. Во всех случаях растворитель – *н*-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

$\sum A$ = 0,68 при $S^2_1 = 1{,}0 \cdot 10^{-4}$. Во вторую выборку входят значения $A_{\Sigma q}$ = 0,74, 0,77 и 0,71, откуда A_Σ = 0,74 при $S^2_2 = 9 \cdot 10^{-4}$. Дисперсии различаются в 9 раз, тогда как $\Phi_{0,01,\ 3,\ 3} = 99$. Дисперсии однородны. Из (7) следует, что S_d = 0,0182. Используем формулу (6): $t_{эксп}$ = (0,74 – 0,68)/0,0182 = 3,3, тогда как $t_{0,01,\ 4}$ = 4,6. Так как $t_{эксп} < t_{0,01}$, различие A_Σ и $\sum A$ не доказано, нуль-гипотеза сохраняется, поэтому светопоглощение смеси толуола и нафталина при 250 нм следует считать аддитивным.

Подстановка числовых значений t в (6) показывает, что при $S^2_1 \approx S^2_2$, m = 3 и α = 0,01 критерием достоверной неаддитивности будет неравенство $|\Delta A| > 3{,}8\ S_2$. При α = 0,05 критерием окажется выражение $|\Delta A| > 2{,}3\ S_2$. Такие числовые значения хорошо согласуются с предложенным И.В.Власовой и А.В.Шиловой эмпирическим критерием неаддитивности [7]:

$$| A_\Sigma - \sum A | > 3\ S. \qquad (8)$$

Величина S в формуле (8) учитывает разброс значений A_Σ при повторном приготовлении и фотометрировании смесей, но не учитывает погрешностей приготовления однокомпонентных растворов. Тем не менее, применение эмпирического критерия (8) обычно приводит к тем же результатам, что и применение теоретически обоснованного критерия (6). Естественно, чтобы исследовать характер светопоглощения некоторой смеси в полном объеме, проверку по критериям (6) или (8) следует повторять при разных длинах волн.

Второй способ основан на сопоставлении регрессий, одна из которых аппроксимирует зависимость $A = f(c_{x1})$ в отсутствие посторонних веществ, а вторая - в присутствии других компонентов смеси. Упрощенный вариант проверки описан в статье [12], более полный предложен З.А.Темердашевым и Т.Г.Цюпко [13]. Однако статистические аспекты проверки ранее не рассматривались. 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. Допустим, в отсутствие посторонних веществ зависимость $A = f(c_{x1})$ адекватно описывается регрессией (9а), а в присутствии X_2 - регрессией (9б):

$$A = b_0 + b_1 c_{x1} \qquad (9а)$$
$$A = b_0^* + b_1^* c_{x1} \qquad (9б)$$

В присутствии X_2 (при c_2 = Const) возможно либо изменение наклона градуировочного графика ($b_1 \neq b_1^*$), либо аномальный сдвиг этого 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:

$$b_0 + A_Y = b_0^*, \qquad (10а)$$
$$b_1 = b_1^*. \qquad (10б)$$

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^* [12]. Алгоритм сравнения средних описан нами в примере 1, повторение вряд ли необходимо.

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 (10б). А именно, светопоглощение смеси следует считать неаддитивным (на уровне значимости α = 1– P), если справедливо неравенство

$$| b_1^* - b_1 | > (\Delta b_1 + \Delta b_1^*). \qquad (11)$$

Проверить гипотезу (10а) несколько сложнее. Она должна отвергаться, если величина сдвига $|b_0^* - b_0|$ не будет принадлежать интервалу $A_{X2} \pm (\Delta b_0 + \Delta b_0^*)$. Аномально большой сдвиг градуировки в присутствии X_2 ведет к неравенству (12а), аномально малый - к неравенству (12б):

$$| b_0^* - b_0 | > A_{X2} + (\Delta b_0 + \Delta b_0^*), \qquad (12а)$$
$$| b_0^* - b_0 | < A_{X2} - (\Delta b_0 + \Delta b_0^*) \qquad (12б)$$

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.

© В.И. Вершинин, И.В. Власова, Т.Г. Цюпко

Таблица 1. Данные к примеру 2

Серия	Раствор	Концентрация, мкМоль/л		*A*	Регрессионные коэффициенты	
		толуол	нафталин		b_0	b_1
1	1-1	-	-	0,000	b_0 = 0,0066 ± 0,0136	b_1 = (0,287 ± 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 ± 0,021	b_1* = (0,306 ± 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		

Все растворы фотометрируют в одинаковых условиях, рассчитывают уравнения градуировочных графиков и попарно сопоставляют регрессионные коэффициенты с учетом погрешностей их оценки. После завершения проверки можно переходить к изучению по тому же алгоритму влияния X_2 на другом концентрационном уровне.

Пример 2. Приготовлены и профотометрированы в одинаковых условиях разные по концентрации растворы толуола, а также разные смеси толуола и нафталина. Во всех случаях растворитель – н-гептан, λ = 250 нм. Концентрация нафталина в смесях одинакова. Числовые данные приведены в таблице 1. Аддитивно ли светопоглощение смесей толуола и нафталина?

Решение.

Подстановка не подтверждает неравенство (11): $|0{,}306 - 0{,}287|\ 10^{-3} < (0{,}042 + 0{,}028)\ 10^{-3}$. Также не подтверждаются неравенства (12а) и (12б). Следовательно, нуль-гипотезу отбросить нельзя. Судя по приведенным данным, светопоглощение растворов толуола, содержащих нафталин на уровне 100 мкмоль/л, при 250 нм следует считать аддитивным.

Третий способ 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 [13]. Однако более информативным вариантом нам представляется расчет статистической модели светопоглощения смеси. Такая модель может включать не только концентрации исходных компонентов, но и их произведения [9,21]. Соответствующие модели мы предлагаем получать 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 мы подбирали по стандартному алгоритму ПФЭ [14,15]. 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 будет приготовить и 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:

$$A^* = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ij} X_i X_j + . \qquad (13)$$

Для получения модели удобно использовать стандартные программы обработки результатов ПФЭ, например программу “PLAN” [15]. Чтобы от кодированных значений факторов (X) перейти к натуральным значениям (c, моль/л), используют соотношение (14), в котором c_i – значение i-го фактора в каком-либо опыте, c_{i0} – его значение в центре плана, I_i – интервал варьирования.

$$X_i = (c_i - c_{i\,0}) / I_i . \qquad (14)$$

Подставляя выражения типа (14) в уравнение (13), получают интерполяционную формулу, непосредственно включающую концентрации компонентов:

$$A^{**} = \mathbf{b_0} + \sum \mathbf{b_i}\, c_i + \sum \mathbf{b_{ij}}\, c_i c_j + \ldots \qquad (15)$$

Выделенные шрифтом регрессионные коэффициенты в формуле (15) обозначены теми же символами b0, bi и bij , что и в формуле (13), описывающей регрессию в кодированных

переменных. Но однотипные коэффициенты в формулах (13) и (15) имеют разную размерность и различаются по своим числовым значениям.

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, то есть модель не включает произведений концентраций; б) после перехода к натуральным переменным все регрессионные коэффициенты вида $\mathbf{b}_i$ 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 вида $\mathbf{b}_i$ 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 $\mathbf{b}_i$ и ε_i .

Пример 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 – н-гептан, λ = 260 нм.[1]

Решение. Выбираем условия проведения ПФЭ (табл.2), готовим 8 смесей с разными соотношениями компонентов, причем каждую смесь готовим и фотометрируем 3 раза (табл.3).

Таблица 2. Условия проведения ПФЭ для смесей ароматических углеводородов

Компонент	Концентрации компонентов (мкмоль/л)				
	c_{max}	I_0	I	(+)	(-)
Нафталин (X_1)	200	100	40	140	60
Антрацен (X_2)	20	10	2	12	8
Толуол (X_3)	1500	470	40	510	430

Компьютерная обработка полученных результатов с помощью программы “PLAN” приводит к выводу об однородности дисперсий и незначимости (при α = 0,01) коэффициентов вида b_{ij}. Линейная регрессия (16) и полученная на ее основе интерполяционная формула (17) оказались адекватными. Как видно из табл.3, невязки не превышают 2%.

$$A^* = 0{,}3658 + 0{,}05083X_1 + 0{,}01750X_2 + 0{,}01167X_3 \quad (16)$$

$$A^{**} = 0{,}014 + 1271c_1 + 8750c_2 + 291{,}8c_3 \quad (17)$$

Модели (16) и (17) не содержат произведений факторов, а коэффициенты вида $\mathbf{b}_i$ в формуле (17) практически совпадают с молярными коэффициентами поглощения углеводородов при 260 нм (табл.4).

Таким образом, нуль-гипотеза не опровергается. Можно сделать вывод об аддитивном характере светопоглощения тройной смеси углеводородов при 260 нм в исследуемой области факторного пространства. Отметим, что ароматические углеводороды в разбавленных растворах при комнатной температуре действительно не реагируют друг с другом, то есть их светопоглощение при любых длинах волн заведомо аддитивно.

Прогнозирование ОА с помощью статистических моделей. После получения статистической модели и выявления неаддитивного характера светопоглощения можно прогнозировать величину ОА для других смесей с тем же качественным составом, но иным соотношением концентраций. Для этого в формулу (3) вместо A_Σ надо подставить найденную в ходе ПФЭ интерполяционную формулу. Кроме того, надо подставить в (3) числовые значения ε_i. Рассмотрим в качестве примера заведомо неаддитивную смесь протолитов, включающую этилендиамин, бензойную и аскорбиновую кислоты [16]. Светопоглощение этой смеси при 255 нм адекватно описывается интерполяционной формулой

$$A^{**} = 0{,}018 - 0{,}1393c_1 - 2146c_2 + 479{,}2c_3 + 20833c_1c_2\,, \quad (18)$$

После ее подстановки в уравнение (3) получаем

$$\Delta A = 0.018 - 0{,}33c_1 - 2766c_2 - 5221c_3 + 20833c_1c_2. \quad (19)$$

Модель (19) показывает, что изменение оптической плотности данной смеси протолитов при 255 нм объясняется как снижением концентраций исходных реагентов, так и появлением продуктов взаимодействия бензойной кислоты с этилендиамином (очевидно, бензоат-ионов). Предсказанные по (19) значения $\Delta\underline{A}$ довольно хорошо совпадают с экспериментальными данными (при определении ΔA по способу [7]). Так, для одной из смесей этилендиамина, бензойной и аскорбиновой кислот в эксперименте получено

[1] Методика эксперимента более детально изложена в работе [16], откуда и заимствован пример 3.

© В.И. Вершинин, И.В. Власова, Т.Г. Цюпко

ΔA = - 0,39 при прогнозируемом ΔA = - 0,34, для других смесей расхождения были еще меньше.

Изложенные в настоящей статье способы проверки аддитивности и прогнозирования ОА имеют общее ограничение: они предназначены лишь для одной, заранее выбранной длины волны. Но одна и та же смесь может аддитивно поглощать свет в одной области длин волн и неаддитивно – в другой [2]. Поэтому терминами «аддитивные смеси» и «неаддитивные смеси» [9] следует пользоваться весьма осторожно. Не меньшая осторожность требуется при интерпретации результатов проверки аддитивности. Сохраняя нуль-гипотезу, нельзя *утверждать*, что светопоглощение смеси аддитивно, а компоненты не реагируют между собой. Неаддитивность светопоглощения может быть выявлена при дальнейшей проверке - на других длинах волн или при других соотношениях компонентов.

Таблица 3. Результаты ПФЭ для смесей ароматических углеводородов

№ опыта	Компоненты			$A_{эксп}$ при 260 нм				A^*	A^{**}
	X_1	X_2	X_3	1	2	3	Средн.		
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 (16), A^{**} - по формуле (17)

Таблица 4. Сопоставление регрессионных коэффициентов ($\mathbf{b}_i$) с молярными коэффициентами поглощения (ε) ароматических углеводородов при 260 нм

Вещество	10^{-3} $\mathbf{b}_i$	10^{-3} ε
Нафталин	1,3	1,3
Антрацен	8,8	8,9
Толуол	0,29	0,28

Таблица 5. Влияние ввода второго компонента (Y) на вид градуировочного графика для определения аскорбиновой кислоты (X) в бинарных смесях

Y	c_Y, мкг/мл	A_Y	Регрессия	Влияние Y	
				изменение наклона	сдвиг графика
Нет	0	0	$A = 0{,}272c_x - 0{,}004$	-	-
Катехол	0.20	0,091	$A = 0{,}270c_x + 0{,}092$	Нет	Нет
Кверцетин	0,40	0,202	$A = 0.187c_x + 0.207$	Да	Нет
Галловая кислота	0,10	0,088	$A = 0{,}271c_x + 0{,}079$	Нет	Нет
	0,40	0,221	$A = 0{,}252c_x + 0{,}222$	Да	Нет

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕДЛОЖЕННЫХ АЛГОРИТМОВ

Все вышеизложенные способы проверки аддитивности были использованы нами для оценки возможности спектрофотометрического определения суммарного содержания биоантиоксидантов фенольного типа [17] по методике [18]. Ее используют для оценки интегральной антиоксидантной активности (АОА) пищевых продуктов, например, сухих красных вин (в пересчете на аскорбиновую кислоту) [19]. Методика [18] основана на добавлении к раствору пробы избытка комплексного реагента-окислителя, содержащего ионы железа(III) и о-фенантролин (или дипиридил). Так как определяемые антиоксиданты (АО) - активные восстановители, они переводят железо в двухвалентное состояние, при этом образуется интенсивно поглощающий в видимой области о-фенантролинат железа(II).

Светопоглощение слабокислого водного раствора через 60 мин после добавления реагента приблизительно пропорционально суммарному содержанию АО в пробе, хотя равновесие за этот период еще не успевает установиться. Обнаружено, что некоторые комбинации АО дают заниженный сигнал [13].

Это не мешает использовать АОА как эмпирический показатель, сравнивая с его помощью разные пробы. Но при определении суммарного содержания АО (в моль/л) неаддитивность аналитического сигнала становится источником систематических погрешностей.

Исследования вели на модельных бинарных и тройных смесях индивидуальных антиоксидантов (аскорбиновая кислота, кверцетин, рутин, галловая кислота, катехол и т.п.). Использовали водные растворы с концентрациями АО порядка 1-20 мкмоль/л, приготовленные по точным навескам из реактивов квалификации х.ч. Спектры поглощения растворов получали на спектрофотометре Agilent 8453 в кювете с толщиной слоя 1,0 см, раствор сравнения – холостой раствор, не содержащий АО. Приготовление и фотометрирование каждого раствора повторяли не менее 3 раз.

Корреляционный анализ спектров поглощения полученных растворов показал, что в заданных условиях аналитический сигнал любого АО создается одним и тем же веществом – о-фенантролинатом железа(II). Тот же продукт образуется при совместном присутствии нескольких АО. Однако светопоглощение некоторых смесей АО на всех длинах волн оказывается аддитивным (рис.1), а других смесей – неаддитивным.

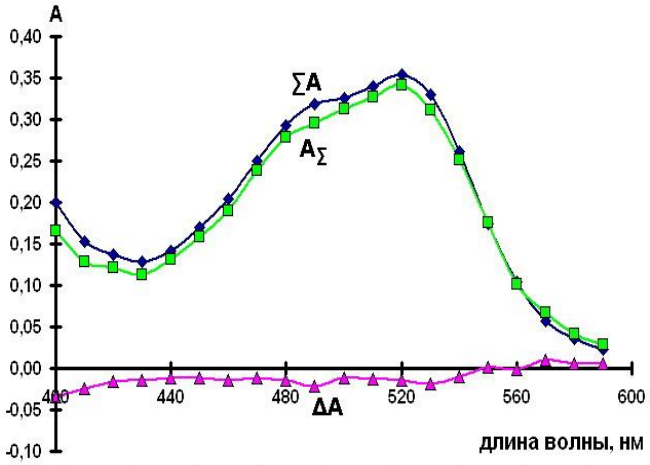

Рис.1. Спектры поглощения продуктов взаимодействия аскорбиновой кислоты и рутина с комплексным реагентом (железо (III) + о-фенантролин).
$C_{АК}$ =2,5·10^{-6}M, $C_{РТ}$ =2,5·10^{-6}M, C_{Fe}=6·10^{-5}M, C_{Phen}= 10^{-4} M. pH 3,5, 25 ^{0}C, τ =60 мин

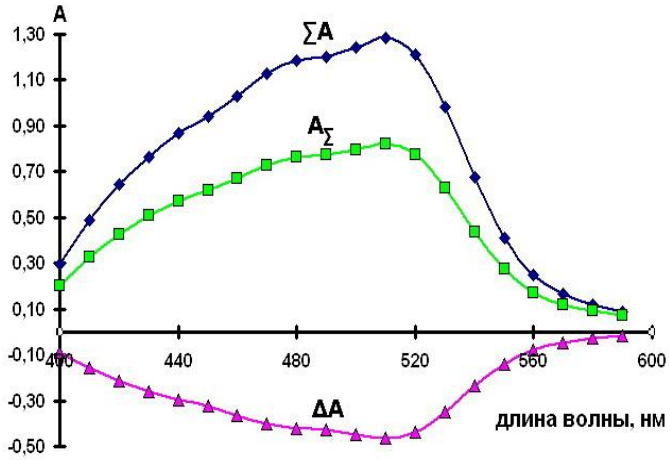

Рис.2. Спектры поглощения продуктов взаимодействия аскорбиновой кислоты и кверцетина с комплексным реагентом (железо(III) + о-фенантролин)
$C_{АК}$ = 10·10^{-6} M, $C_{КВ}$ = 3·10^{-6} M, C_{Fe}=6·10^{-5} M, C_{Phen}=10^{-4} M. pH 3,5, 25 ^{0}C, τ = 60 мин

Факт неаддитивности был установлен при статистическом сравнении средних значений A_{Σ} и ΣA при нескольких значениях λ, то есть первым способом. Особо заметны отрицательные ОА в системе аскорбиновая кислота – кверцетин (рис.2), где в некоторых случаях уровень ОА доходил до -36%.

Дополнительная проверка по второму способу показала, что при постоянной концентрации кверцетина абсолютные значения отклонений тем больше (по модулю), чем выше концентрация аскорбиновой кислоты (табл.5). Аналогичный (но более слабый) эффект наблюдали, например, в случае смесей,

© В.И. Вершинин, И.В. Власова, Т.Г. Цюпко

содержащих относительно много галловой кислоты. Для рутина, катехола, а также малых содержаний галловой кислоты ОА оказались статистически не достоверными.

Используя третий способ проверки, мы установили, что в рекомендуемых для определения АОА концентрационных условиях [18] аналитический сигнал при 510 нм для смесей аскорбиновой кислоты (X_1) и кверцетина (X_2), взятых на уровне $n \cdot 10^{-6}$ М, отвечает нелинейной интерполяционной формуле:

$$A^{**} = 0{,}0955 + 9{,}19 \cdot 10^4 c_1 + 2{,}89 \cdot 10^4 c_2 - 0{,}942 \cdot 10^4 c_1 c_2$$

Дальнейшие расчеты с применением статистических моделей показали, что отклонения от аддитивности должны уменьшаться при использовании более разбавленных растворов аскорбиновой кислоты и кверцетина, что и было подтверждено в эксперименте. Очевидно, при определении суммарного содержания этих АО по методике [18] следует вводить пробы минимального объема, чтобы снизить общее содержание АО в реакционной смеси.

Дополнительная проверка показала, что в отсутствие реагента-окислителя собственное светопоглощение смесей тех же антиоксидантов в УФ области аддитивно даже в области концентраций, превышающих 10 мкмоль/л. По-видимому, непосредственного взаимодействия аскорбиновой кислоты и кверцетина в растворе не происходит, а формирование ОА при параллельном протекании двух фотометрических реакций объясняется другими причинами. Например, конкуренцией антиоксидантов при нехватке реагента-окислителя[2] и постепенным замедлением обеих реакций.

Это предположение было подтверждено в эксперименте, включавшем несколько ПФЭ. Оказалось, что при увеличении объема добавляемого комплексного реагента-окислителя в 3-5 раз светопоглощение растворов, одновременно содержащих аскорбиновую кислоту ($<10^{-5}$ М) и кверцетин ($<3 \cdot 10^{-6}$ М), становится аддитивной величиной. Так, при тройном увеличении избытка окислителя адекватна простейшая модель

$$A^{**} = -0{,}043 + 10{,}7 \cdot 10^4 c_1 + 2{,}84 \cdot 10^4 c_2 .$$

Выявленное с помощью серии статистических моделей влияние объема реагента на аддитивность аналитического сигнала следует учитывать, оптимизируя методику определения суммы антиоксидантов.

Приведенный пример показывает, что при разработке методик спектрофотометрического анализа неразделенных смесей проверка аддитивности аналитического сигнала должна стать столь же обычной процедурой, как оценка чувствительности или селективности. Желательно проверять аддитивность светопоглощения модельных смесей в разных условиях (при варьировании длины волны, величины pH, концентрации реагента и т.п.).

Такая проверка может проводиться одним из способов, изложенных в настоящей статье, хотя возможны принципиально иные подходы. Свои преимущества имеют способы проверки аддитивности, в которых используют данные, полученные в широком интервале длин волн. Эти данные обрабатывают методами корреляционного анализа [8] или по специальному алгоритму, родственному однофакторному дисперсионному анализу [21]. Однако многоволновые способы гораздо сложнее, чем описанные в данной статье, они применимы далеко не во всех случаях и требуют отдельного рассмотрения.

Авторы благодарят Н.А.Николаеву и М.А.Харькову за участие в проведении эксперимента, д.ф.м.н Н.В.Перцева за уточнение статистических алгоритмов. При обсуждении результатов работы ценные замечания были сделаны докт. хим. наук З.А.Темердашевым и докт. хим. наук С.Н. Штыковым, которым авторы выражают глубокую признательность. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (госконтракт П-1103).

ЛИТЕРАТУРА

1. Берштейн И Я., Каминский Ю.А. Спектрофотометрический анализ в органической химии – Л.: Химия, 1986. – 200 с.

2. Власова И.В., Вершинин В.И., Цюпко Т.Г. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Проблема неаддитивности светопоглощения // Журн. аналит. химии. – 2011 – 66, № 1. – С.85-93. (в печати).

3. Власова И.В., Вершинин В.И. Возможность определения компонентов бинарных смесей по методу Фирордта с погрешностями, не превышающими заданный

[2] Отметим, что для окисления 1 молекулы кверцетина требуется 5 ионов Fe^{3+} [20], а для формирования соответствующего числа частиц окрашенного комплекса – 15 молекул о-фенантролина.

предел // Журн. аналит. химии. – 2009 – 64, № 6. – С. 571-576.

4. Родионова О.Е., Померанцев А.Л. Хемометрика в аналитической химии // URL: http://www.chemometrics.ru/materials/articles/chemometrics_review.pdf.

5. Бабко А.К., Пилипенко А.Т. Фотометрический анализ. Общие сведения и аппаратура. – М.: Химия, 1968. – С. 62.

6. Кац М.Ф. О количественной оценке степени неаддитивности при анализе многокомпонентных смесей по спектрам поглощения // Журн. прикл. спектроскопии. 1973.– 43, № 1 – С.151-152.

7. Власова И.В., Шилова А.В. Новые подходы к спектрофотометрическому анализу многокомпонентных смесей // Вісник Харківського національного університету. 2007 – № 770. Хімія. 15(38).– С.141-146.

8. Сагайдачный С.Н., Солдатов В.Н. Проверка аддитивности многокомпонентных смесей методом корреляционного анализа // Журн. аналит. химии. 1986.– 41. № 2. – С. 224.

9. Васильев А.Ф. Новые возможности анализа многокомпонентных смесей по спектрам поглощения / Применение ЭВМ в химических и биохимических исследованиях. – М.: Химия, 1976. – С.246.

10. Смагунова А.Н., Карпукова О.М. Методы математической статистики в аналитической химии. – Иркутск : ИрГУ. 2008. – 290 с.

11. Пустыльник Е.И. Статистические методы анализа и обработки наблюдений – М.: Наука. 1968. – С.142-144.

12. Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S.E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamines C and E : CUPRAC method // J. Agric. Food Chem. – 2004. – 52, № 26. – P. 7970-7981.

13. Темердашев З.А., Цюпко Т.Г. Проблемы и аналитические решения при определении антиоксидантной активности пищевых продуктов / Аналитика России-2009. Материалы III Всероссийской конференции – Краснодар: КубГУ, 2009. – С. 428.

14. Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий – М.: Наука, 1976. – 279 с.

15. Вершинин В.И., Перцев Н.В. Планирование и математическая обработка результатов химического эксперимента – Омск : ОмГУ, 2005. – 215 с.

16. Вершинин В.И., Харькова М.А., Власова И.В. Планирование эксперимента как способ изучения отклонений от аддитивности светопоглощения // Вестник Омского университета – 2010, № 2 – С.91-98.

17. Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека – М.: Транслит. 2009 – 212 с.

18. Темердашев З.А. Цюпко Т.Г., Воронова О.Б., Храпко Н.В., Балаба А.Н. Определение антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы Fe(III)/Fe(II) – органический реагент // Заводск. лаборатория. 2006. – 72. № 11. – С.15-19.

19. Цюпко Т.Г., Темердашев З.А., Воронова О.Б., Храпко Н.В., Переверзева Е.В., Перекотий В.В. Определение антиоксидантной активности сухих красных вин для оценки их качества // Заводск. лаборатория. 2008. – 74, № 6 – С.14 - 17

20. Зиятдинова Г.К., Низамова А.М., Будников Г.К. Оценка биодоступности полифенолов по данным гальваностатической кулонометрии. / Аналитическая химия - новые методы и возможности. Съезд аналитиков России. 26-30 апреля 2010 г. Тезисы докладов. – М.: МИСИС, 2010. – С.428.

21. Khots M.S., Nazarov V.I., Lyovin A.A. Statistical analysis of non-additivity in spectra of multicomponent mixtures // Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 1993 – 18, № 3 – p. 281-284.

© В.И. Вершинин, И.В. Власова, Т.Г. Цюпко