

## ЕКОЛОГО-ГІГІЄНІЧНІ, ІНФОРМАЦІЙНО-ТЕХНОЛОГІЧНІ ТА ІНШІ ПИТАННЯ

УДК 543:615.2

### ПРОБЛЕМА ДИСКРИМИНАЦИИ КОМПОНЕНТОВ ПРОБЫ НА ПРИМЕРЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

*Останина Н.В., Левин М.Г., Стрельченко И.А., Кузнецова Е.М., Череменко А.Н.  
ГУ «Институт гигиены и медицинской экологии им. А.Н. Марзеева НАМН Украины», г. Киев*

**Введение.** Многие компоненты и примеси в продуктах, используемых человеком (например, в лекарственных препаратах, пищевых продуктах, диетических добавках, косметических препаратах), являются достаточно летучими органическими соединениями и, как следствие, могут определяться при помощи метода газовой хроматографии (ГХ). Для таких объектов основным «конкурирующим» методом определения является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). По мнению авторов по всем основным показателям аналитического качества ГХ не уступает или даже превосходит ВЭЖХ, кроме одного, к сожалению, ключевого, так как ГХ в отличие от ВЭЖХ требует фазового перехода пробы из жидкого (как правило) состояния в газообразное. Многие

соединения недостаточно летучи, чтобы полностью перейти в газовую фазу в инжекторе газового хроматографа не претерпев частично или полного термического разложения (пиролиз), и, как следствие, такие соединения просто невозможно определять методом ГХ [1].

Но и с теми соединениями, которые потенциально возможно определять, все обстоит непросто, поскольку перед тем, как попасть в колонку и затем в детектор, соединение должно претерпеть фазовый переход. Именно с этим обстоятельством связана одна из основных проблем газовой хроматографии – явление дискриминации компонентов пробы [2]. Рассмотрению аналитических последствий этого явления и посвящена данная статья.

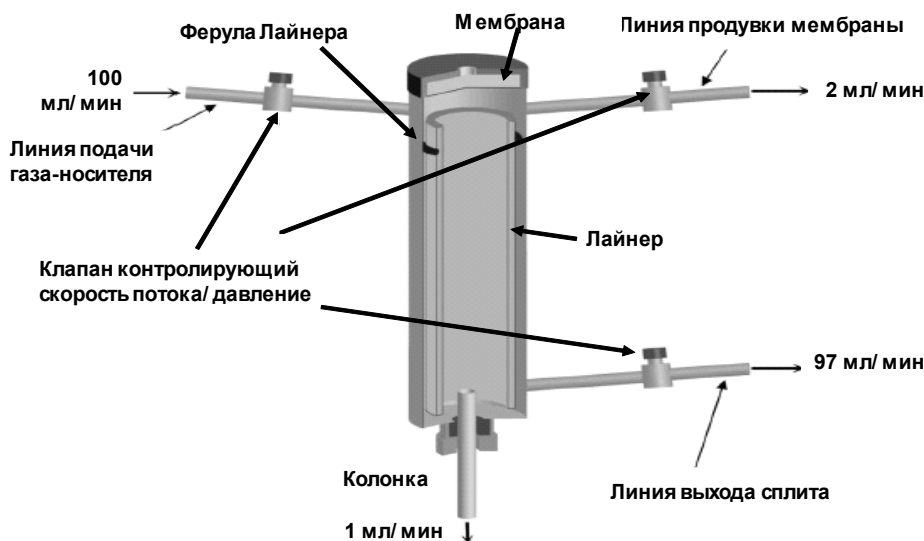


Рисунок 1. Схематическое представление ГЖ-инжектора.

**Цель статьи.** Целью данной статьи является качественное рассмотрение вопроса аналитических последствий процесса дискриминации пробы при проведении испытательного методом ГХ.

**Объект и методы исследований.** На рисунке 1 схематически представлен типичный ГХ инжектор.

ГХ инжекторы бывают с делением потока и без деления потока (на хроматографическом жаргоне со сплитом и без сплита),

в случае отсутствия сплита просто отсутствует линия выхода сплита, однако линия продувки мембраны присутствует практически всегда.

На рисунках 2 и 3 схематически представлены процессы, происходящие в ГХ инжекторе после попадания в него жидкой (реже твердой) пробы, так что часть газовой фазы, возникшей в результате испарения пробы, в любом случае не попадает в колонку.

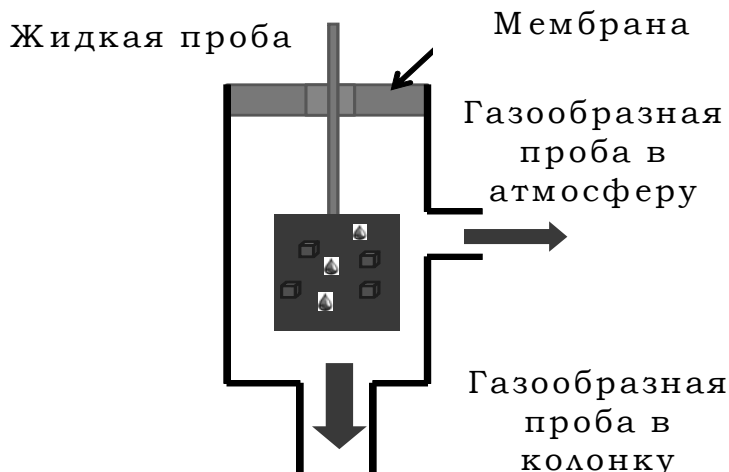


Рисунок 2. Схематическое представление процесса попадания жидкой пробы в ГХ-инжектор.

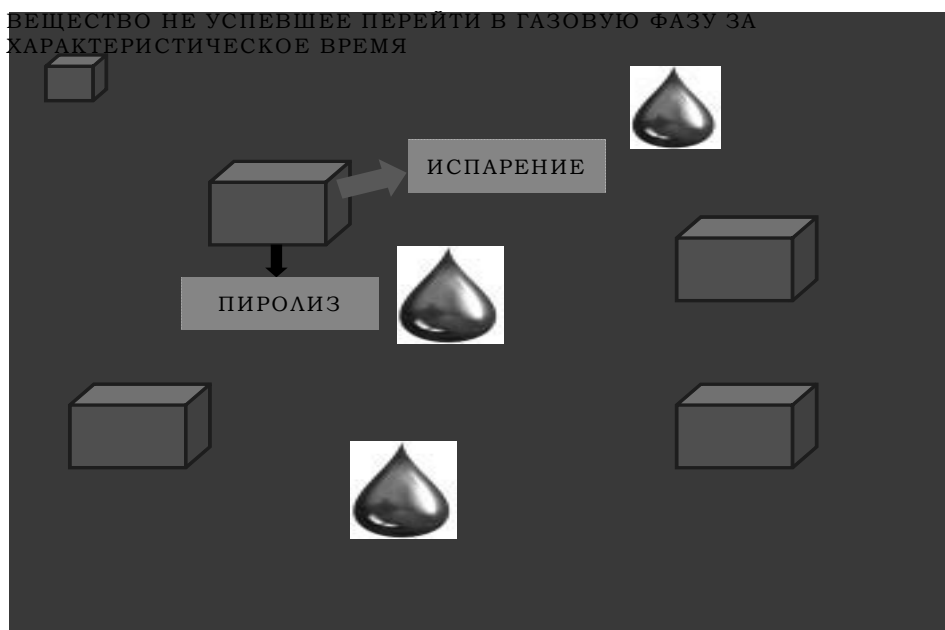


Рисунок 3. Схематическое представление фазовых переходов при попадании пробы в ГХ-инжектор.

**Результаты и их обсуждение.** При попадании жидкой пробы в нагретый ГХ-инжектор растворитель пробы быстро испаряется (за время порядка 10-1000 мик-

росекунд (*характерное время испарения*), при этом имеют место следующие явления:

1. Объем пробы увеличивается на 2-3 порядка (фазовый переход жидкость газ).

Так 1 мл (г) води дае  $1/18 \cdot 22000 \approx 1000$  мл газовай фазы пры нормальных умовах.

- Температура жидкості пры проходжанні фазовага перахода прыкладна равна тэмпературы фазовага перахода жидкость-газ пры даўленні некалькіх вышэй атмасфернага (1.5-2 атмасферы).

Кампаненты, абладаючы летучасцю, сярнямай з летучасцю растваральна, пераходзяць у газавую фазу адначасова з растваральна. Летучасць ці фуґітывнасць (*fugacity*) – тэрмадынамічная велічына, служачая для запісу залежнасці хімічнага патэнцыяла індывідуальнага рэчыва ці кампанента сумесі, прыкладна прапарцыянальна даўленню насычанага пара даннага злучэння пры даннай тэмпературы, т.е. чым большэй гэтая велічына, тым хутчэй злучэнне перайдзе з жидкай ці цвёрдай фазы ў газавую [3].

- Кампаненты, летучасць якіх значна меншэй летучасці растваральна, канцэнтруюцца ў змяншаючымся аб'ёме жидкай фазы і абраўюць мікрэкрystalлы ці мікродроплеты (следует адзначыць, што ў адлічце ад заражэнных дроплет, абраўючыхся ў істочніках іонаў, рабаўючых пры атмасфернаму даўленню, гэты працэс не носіць взрывнога характэра, пры

каторым аналіты практычна цалкам пераходзяць у газавую фазу), каторыя абраўюць взвесь ў газавой фазе і такжэ пачынаюць іспарыцца. Даннаму працэсу ідыць, як правіла, медленней, чым іспарэнне растваральна і кампанентаў, сярнямай з ім па летучасці, і падчас суправаджаецца піролізам. Следует адзначыць, што ў адлічце ад заражэнных дроплет, абраўючыхся ў істочніках іонаў, рабаўючых пры атмасфернаму даўленню, гэты працэс не носіць взрывнога характэра, пры каторым выхад аналітаў ў газавую фазу сутэственна аблегчаецца [4].

- Описанный процесс приводит к тому, что те аналіты, каторыя імаюць летучасці, супаставімыя з летучасцю растваральна, за характэрнае врэмя цалкам пераходзяць ў газавую фазу, як следствіе, адношэнне іх мас/канцэнтрацый ў газавой фазе (представляемай ў колонку) такое жэ, як саотношэнне іх мас/канцэнтрацый ў жидкай фазе. Для аналітаў з меншэй летучасцю, чым у аналітаў з перавай групы, на колонку пападае, саответствэнна, і меншэйшая частка. Т.е. імаеце месце дыскрымінацыя кампанентаў пробы па летучасці. Гэта з'явлэнне можна праілюстравіць графікам, представлэнным на рыс. 4.



Рисунок 4. Схематическое представление дискриминации компонентов пробы по летучести. Q-отношение массы анализата в газовой фазе к массе рэчыва ў ісходнай пробе.

Если хотя бы часть анализата пападае ў абласць дыскрымінацыі (рыс. 4), то для іх, чым большэй ступень дыскрымінацыі, тэм меншэй адношэнне палучаемай плошчды піка такога анализата па сярнямаю з ожі-

даемай. На рыс. 5 [5] представлена хроматограма пробы, представляючэй сабой раствар прэделных лінейных углеводородов  $C_{10}-C_{16}$  ( $C_{10}H_{22}$  ( $t_{\text{кипения}} = 174^{\circ}C$ ) –  $C_{16}H_{34}$  ( $t_{\text{кипения}} = 287^{\circ}C$ )) ў гексане ( $C_6H_{14}$  ( $t_{\text{кипения}} =$

68<sup>0</sup>C)), причем концентрация каждого аналита составляла 0.5 мг/мл с использованием пламенно-ионизационного детектора, для которого отклик по каждому из соединений одинаков. Площадь же пиков постепенно уменьшается по мере роста числа атомов уг-

лерода в молекуле (и увеличения температуры кипения, т.е. уменьшения летучести, так, что площадь пика последнего аналита (C<sub>16</sub>) составляет всего около половины от площади пика первого аналита (C<sub>10</sub>).

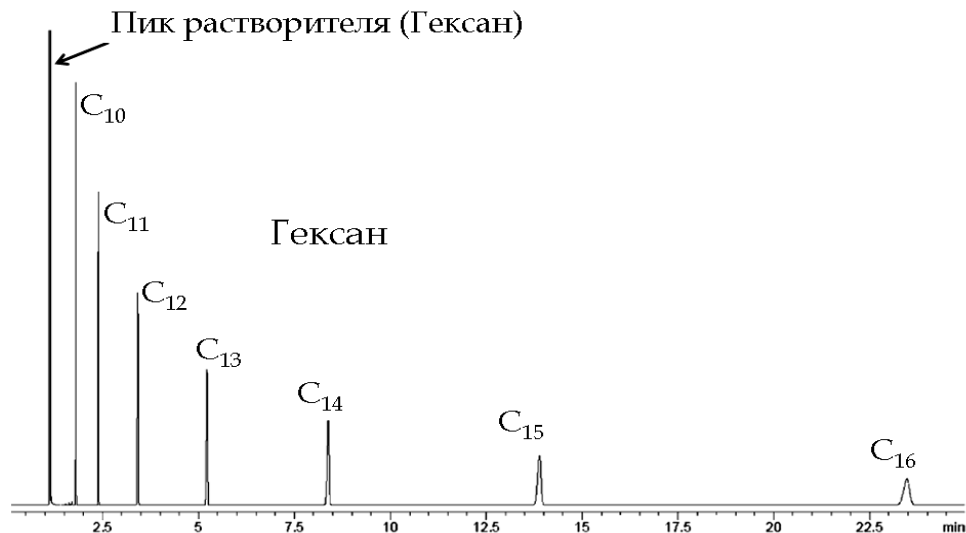


Рисунок 5. Пример дискриминации пробы в теле инжектора из [1], площадь последнего аналита примерно в 2 раза меньше площади первого.

### Выводы из теоретического рассмотрения явления дискриминации компонентов пробы в ЖХ:

1. Наибольшая дискриминация пробы будет иметь место в случае наличия больших различий между растворителем и аналитами, которые обладают малой летучестью, причем, чем больше эта разница, тем больше степень дискриминации, т.е. тем меньше отношение площади, получаемой аналита к ожидаемой площади пика этого аналита.
2. Степень дискриминации одной и той же пробы должна зависеть от конструкции, состояния инжектора, рабочих характеристик конкретного прибора, и используемой методики, в частности от растворителя пробы, вводимой в хроматограф. Следует заметить, что наиболее существенной дискриминация пробы должна быть (что и наблюдается) для инжекторов с делением потока (т.е. при наличии сплита).

Представленные выше выводы в аналитическом плане можно сформулировать в виде следующих рекомендаций:

1. Необходимо иметь максимально полный набор референсных стандартов аналитов,

для этих аналитов можно избежать систематических погрешностей определения, связанных с дискриминацией пробы, как минимум двумя способами:

- 1.1 Приготовлением референсных и испытуемых растворов, таким образом, чтобы состав растворителей в обоих случаях был максимально близок. Т.е. растворитель референсных растворов должен содержать все значимые в этом плане компоненты пробы.
- 1.2 Использованием метода добавок.
2. При отсутствии референсных стандартов количественные оценки проводимые методом внутренней нормализации или с использованием пересчета по иному веществу могут быть отягощены систематической ошибкой, которая будет зависеть от конкретного прибора и конкретной методики.

В качестве примера проявления дискриминации пробы в ГХ рассмотрим результаты межлабораторного исследования, в рамках которого 28 лабораторий имеющих соответствующую аккредитацию из различных стран СНГ анализировали содержание примесей в идентичных пробах глицерина

[6]. Анализ проводился по методике, описанной в Европейской Фармакопее (Glycerol, Ph. Eur. Monograph 0496) [7]. Перед участниками испытаний было поставлено три вопроса:

1. Определить содержание в пробе примеси А (диэтиленгликоль). Примесь А определяется методом стандарта, причем в качестве референсного раствора используется раствор, содержащий известную концентрацию самой примеси А в растворителе, который представляет собой воду с таким же содержанием глицерина, как и испытуемый раствор. Таким образом для примеси А выполнено условие корректного применения (пункт 1.1 рекомендаций).
2. Определить содержание примесей, выходящих до пика глицерина (кроме примеси А) (методом сравнения с примесью А).
3. Определить содержание суммы примесей, выходящих после пика глицерина (методом сравнения с примесью А).

Растворителем проб, инжестируемых в хроматограф, в соответствии с методикой была вода. Поскольку температуры кипения диэтиленгликоля (245<sup>0</sup>С) и глицерина (290<sup>0</sup>С) и всех остальных родственных соединений глицерина, особенно выходящих после пика глицерина, значительно больше температуры кипения воды, в данном случае следовало ожидать значительной дискриминации пробы. Отметим, что в связи с тем, что аналиты в ГХ удерживаются в порядке, который в значительной степени определяется возрастом температуры их кипения (т.е. в порядке уменьшения летучести), особенно сильно дискриминация пробы должна проявляться по отношению к аналитам, выходящим после пика глицерина, т.е. имеющим наименьшие летучести. Типичная хроматограмма испытуемого раствора, полученная для данного образца глицерина представлена на рис. 6.

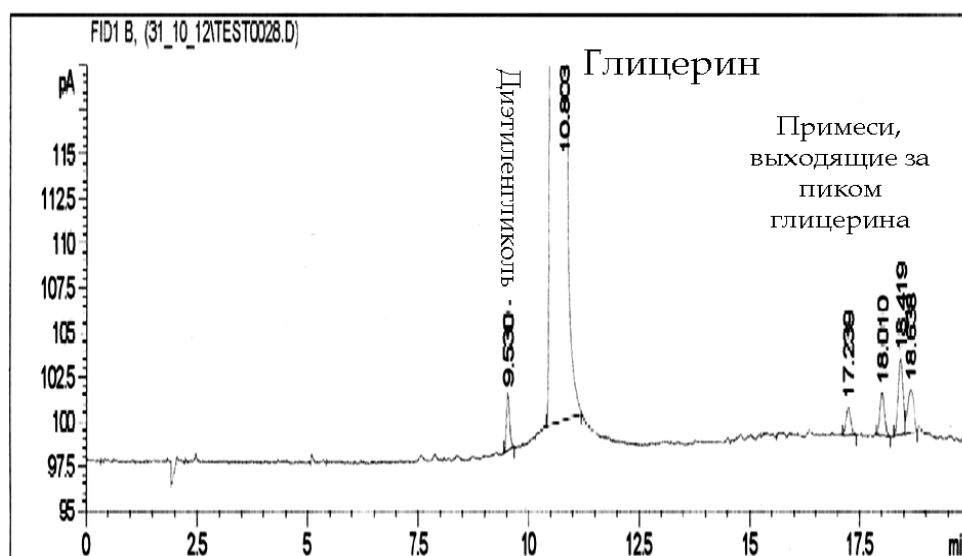


Рисунок 6. Типичная хроматограмма испытуемого раствора образца глицерина.

На рис. 7 представлены результаты участников по пунктам 1-3 задания, а именно определение примеси А, наличия или отсутствия ниже определенного предела любой примеси кроме примеси, выходящей до пика глицерина, и суммы примесей, выходящих после пика глицерина (сумма Y). Отметим, что пункт 2, предполагал ответ «да» или «нет» и, следовательно, интерпретация ре-

зультатов по этому пункту затруднительна и далее проводиться не будет.

Как известно, крайние результаты часто отягощены аналитическими промахами, что затрудняет выявление физико-химических закономерностей, поэтому проанализируем результаты, лежащие внутри квантиля представляющего две трети результатов (смотри рис. 8) (коричневый цвет на рисунке).

Код участника	Примесь А, %	Х (есть/нет)	Сумма Y, %
28	0.073	нет	0.34
23	0.073	нет	0.32
7	0.07	нет	0.45
18	0.07	нет	0.3
33	0.07	нет	0.36
47	0.07	нет	0.36
37	0.07	нет	0.29
14	0.07	нет	0.32
4	0.074	нет	0.323
10	0.069	нет	0.39
22	0.075	нет	0.326
36	0.076	нет	0.019
48	0.076	нет	0.39
6	0.068	нет	0.28
35	0.067	нет	0.11
5	0.067	нет	0.28
17	0.079	нет	0.18
34	0.079	нет	0.34
15	0.072	нет	0.36
46	0.08	да	0.36
26	0.08	нет	0.4
55	0.06	да	0.2
1	0.09	да	0.4
40	0.0536	да	0.022
31	0.053	нет	0.242
19	0.05	нет	0.7
50	0.01	нет	0.02
11	0.43	нет	0

Рисунок 7. Результаты, полученные 28 лабораториям.

№	Код участника	Примесь А, %	Код участника	Сумма Y, %
1	50	0.01	11	0
2	19	0.05	36	0.019
3	31	0.053	50	0.02
4	40	0.0536	40	0.022
5	55	0.06	35	0.11
6	35	0.067	17	0.18
7	5	0.067	55	0.2
8	6	0.068	31	0.242
9	10	0.069	6	0.28
10	7	0.07	5	0.28
11	18	0.07	37	0.29
12	33	0.07	18	0.3
13	47	0.07	23	0.32
14	37	0.07	14	0.32
15	14	0.07	4	0.323
16	15	0.072	22	0.326
17	28	0.073	28	0.34
18	23	0.073	34	0.34
19	4	0.074	33	0.36
20	22	0.075	47	0.36
21	36	0.076	15	0.36
22	48	0.076	46	0.36
23	17	0.079	10	0.39
24	34	0.079	48	0.39
25	46	0.08	26	0.4
26	26	0.08	1	0.4
27	1	0.09	7	0.45
28	11	0.43	19	0.7

Рисунок 8. Упорядоченные Результаты тестов 1 и 3 по всем 28 лабораториям. Красным цветом, выделены, представляющие, квантиль результатов потенциально отягощенных аналитическими пробах (1/3 всех результатов).

По 20 оставшихся результатов каждого теста обрабатывали, получив отклонения от среднего, и по отношению к этому среднему

в процентах, эти данные представлены на рис. 9 и 10.

№	Примесь А, %	Сумма Y, %	Примесь А	Сумма Y
1	0.06	0.11	-15.6	-60.3
2	0.067	0.18	-5.8	-35.0
3	0.067	0.2	-5.8	-27.8
4	0.068	0.242	-4.4	-12.6
5	0.069	0.28	-3.0	1.1
6	0.07	0.28	-1.6	1.1
7	0.07	0.29	-1.6	4.7
8	0.07	0.3	-1.6	8.4
9	0.07	0.32	-1.6	15.6
10	0.07	0.32	-1.6	15.6
11	0.07	0.323	-1.6	16.7
12	0.072	0.326	1.2	17.7
13	0.073	0.34	2.6	22.8
14	0.073	0.34	2.6	22.8
15	0.074	0.36	4.0	30.0
16	0.075	0.36	5.4	30.0
17	0.076	0.36	6.9	30.0
18	0.076	0.36	6.9	30.0
19	0.079	0.39	11.1	40.9
20	0.079	0.39	11.1	40.9

Рисунок 9. Результаты тестов 1 и 3 по 20 лабораториям (срединная квантиль). Последние два столбца представляют собой нормализованные отклонения от среднего значения по представленной выборке. Прямоугольниками выделены значения, попадающие в области допустимых отклонений для примесей ±15% (смотри текст).

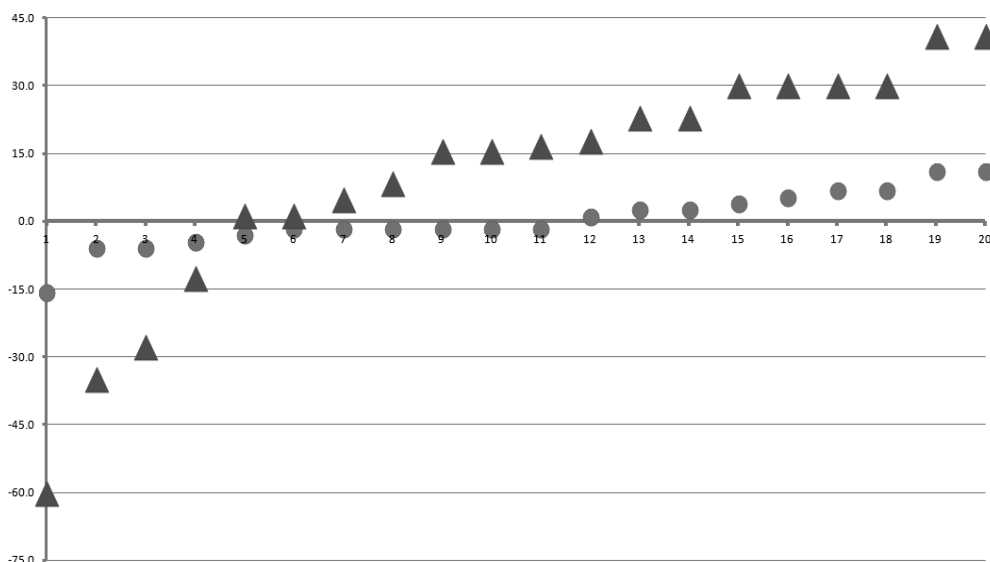


Рисунок 10. Графическое представление данных Рисунка 9. Кружки – нормализованные отклонения от среднего для определения примеси А, треугольники – нормализованные отклонения для определения суммы примесей, выходящих после пика глицерина.

**Обсуждение результатов.** Представленные выше данные свидетельствуют о том, что в случае определения примесей в субстанции глицерин методом ГХ по Европей-

ской Фармакопее имеет место дискриминация компонентов пробы. Но в случае определения примеси А аналитическое проявление этого физико-химического явления су-

ществено сглажено и все результаты, кроме одного, попадают в квантиль 2/3 результатов, мало отягощенных грубыми аналитическими промахами, и, соответственно, попадают в диапазон, характерный для типичного разброса результатов для примесей  $\pm 15\%$  (если истинным значением считать среднее значение для этой выборки). В случае определения суммы примесей, выходящих после пика глицерина, стандартизация которых идет по стандарту примеси А, не выполняет-

ся ни одно из аналитических рекомендаций и, как следствие, только 4 результата из 20 попадают (всего 20% процентов результатов) в диапазон, характерный для типичного разброса результатов для примесей  $\pm 15\%$ . Данный факт свидетельствует о том, что некомпенсированная дискриминация пробы в данном случае выступает в качестве «случайной погрешности», т.е. для каждой лаборатории она имеет свою собственную весьма значительную величину.

### Выводы

Для противодействия значимой аналитической погрешности, связанной с явлением дискриминации пробы можно предложить четыре типа «защитных мер».

1. *«Грамотность» – квалификация аналитиков.* Аналитик должен понимать, в каких случаях ГХ определения возможна значимая дискриминация пробы в инжекторе.
2. *Физико-химические и инструментальные.* Если реализация методики на имеющемся оборудовании чревата значимой дискриминацией пробы, то следует использовать специальные инжекторы, а при невозможности использования специальных инжекторов специальные лайнеры для доступных инжекторов, которые позволяют минимизировать это явление. Минимизировать объем инъекции и использовать оптимальный растворитель пробы вводимой в инжектор газового хроматографа.
3. *Аналитические.* В качестве аналитических мер снижения влияния этого явления можно предложить грамотное использование сравнения и калибровки, в частности использование представленных выше рекомендаций.
4. *Нормативные.* При разработке и утверждении методик такого рода следует выявлять и указывать в явном виде критические параметры методики, позволяющие сделать явление дискриминации пробы не значимым. Необходимо использовать такой тест пригодности системы, который позволил бы выявить наличие аналитически значимого явления дискриминации пробы и указывать необходимые корректирующие действия, проводить правильную валидацию методики, позволяющую подтвердить то, что дискриминация пробы действительно находится под контролем.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Grob R., Eugene B. Modern practice of gas chromatography fourth edition Copyright 2004 by John Wiley & Sons, Inc, – 1045 p.
2. Grob K. Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography – Concepts, Processes, Practical Guidelines, Sources of Error WILEY-VCH, 2001, – 460 p.
3. Ball D. Physical Chemistry, Second Edition // 2014 Cengage Learning (ISBN-13: 978-1-133-95843-7), P. 853
4. Cole R. Electrospray and MALDI Mass Spectrometry Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications // 2010 by John Wiley & Sons, – 847 p..
5. Rood D. The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers // 2007 WILEY-VCH, ISBN978-3-527-31373-0, – 326 p.
6. Отчет по результатам 9-гораунда Программы профессионального Тестирования лабораторий контроля качества лекарственных средств. Определение примеси А и сопутствующих примесей В образце глицерина методом ГХ, 2012, – 9 с.
7. European Pharmacopoeia //On-line Version available at: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-8th-edition-1563.html>.



**ПРОБЛЕМА ДИСКРИМІНАЦІЇ КОМПОНЕНТІВ ПРОБИ НА ПРИКЛАДІ  
ВИЗНАЧЕННЯ ДОМІШОК МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ**

*Останіна Н.В., Левін М.Г., Стрельченко І.А., Кузнецова О.М., Черемєнко А.Н.*

*Газова хроматографія (ГХ) являє собою дуже корисний і потужний інструмент кількісного аналізу для практично будь-якого типу об'єктів. Основні обмеження ГХ виникають внаслідок необхідності фазового переходу з рідини в газ (що потрібно в переважній більшості випадків). Дана стаття присвячена розгляду одного з негативних аналітичних наслідків цього фазового переходу, відомого як дискримінація проби в ГХ з прикладом прояву цього явища в міжлабораторному дослідженні домішок в зразку гліцерину.*

**PROBLEM OF DISCRIMINATION OF SAMPLE COMPONENTS BY GAS  
CHROMATOGRAPHY WITH IMPURITIES DETERMINATION AS AN EXAMPLE**

*N. Ostanina, M. Levin, I. Strelchenko, O. Kuznetsova, A. Cheremenko*

*Gas chromatography (GC) is very useful and powerful tool in quantitative analysis of practically for any types of objects. The main limitations of GC arise from the necessity of the phase transition from liquid to gas (required in overwhelming majority of cases). This article is dedicated to consideration of one of negative analytical consequence of this phase transition known as sample discrimination in GC with real life example of its manifestation in interlaboratory study of impurities in glycerol sample.*

УДК: 615.07:004

**НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ  
РАБОТЫ ВЕБ-САЙТА ЛАБОРАТОРИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

*Влодек А.Б.*

*ГУ «Институт гигиены и медицинской экологии им. А.М. Марзеева НАМН Украины», г. Киев*

**Введение.** Работа современной испытательной лаборатории, аккредитованной на соответствие международным стандартам компетенции и качества, предполагает обмен больших объемов информации, как с заказчиками, так и с потенциальными потребителями её услуг. Одним из способов коммуникации с удаленными клиентами является интерактивное общение с использованием веб-сайта лаборатории.

Сегодня говорить о том, что у испытательной лаборатории есть свой сайт в Интернете, это – не говорить о нём ничего. Просто наличие Интернет-проекта уже не является доказательством компетентности лаборатории и не свидетельствует о её высоком уровне. Однако и о том, и о другом говорит качество веб-сайта. Веб-сайт с грамотно составленным контентом и правильно ор-

ганизованной поддержкой является мощным инструментом коммуникации с потребителями услуг и визитной карточкой лаборатории в сети Интернет.

**Актуальность темы.** Доступность сети Интернет и сервисов на её базе растут год от года. Это создало возможности создания и активного развития так называемых веб-сообществ – групп людей, имеющих общие интересы и общающихся преимущественно через Интернет.

Создание веб-сообщества «Лаборатория-Заказчики» на основе веб-сайта лаборатории даёт возможность организовать эффективный контакт с потребителями услуг лаборатории, проводить в электронной форме анкетирование посетителей, рассмотрение жалоб и рекламаций клиентов, обсуждение тех или иных проблем, связанных с дея-