



Чеховский П.В.¹, Гурина М.А.¹, Походня Ю.Г.¹, Шилейко И.Д.²✉, Чубуков А.М.³,
Соболенко В.М.³, Юхнель О.М.³

¹ Национальная антидопинговая лаборатория, Минск, Беларусь

² Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

³ Минский городской клинический наркологический центр, Минск, Беларусь

Парофазный анализ в исследовании летучих токсических веществ

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Чеховский П.В. – концепция, дизайн исследования, написание текста; Гурина М.А. – сбор материала, обработка; Походня Ю.Г. – написание текста, редактирование; Шилейко И.Д. – дизайн исследования, написание текста, литературный обзор; Чубуков А.М. – концепция, дизайн исследования; Соболенко В.М. – сбор материала, обработка; Юхнель О.М. – написание текста, редактирование.

Подана: 27.01.2023

Принята: 27.02.2023

Контакты: irina.shileiko@yandex.by

Резюме

Введение. Результаты выполнения химико-токсикологического анализа во многом определяются качеством осуществления преаналитического этапа лабораторного исследования. Применительно к исследованию в биологическом материале летучих токсических веществ эффективным методом подготовки проб считается парофазный анализ.

Цель. Научно обосновать и разработать валидированный метод идентификации в моче летучих токсических веществ и количественного определения в ней ацетона с использованием технологии статического варианта парофазного анализа.

Материалы и методы. Методом газожидкостной хроматографии с парофазным анализом исследована 41 проба мочи добровольцев: 36 проб с добавлением аналитов и(или) внутреннего стандарта и 5 проб, не содержащих аналитов и внутреннего стандарта.

Результаты. Установлены условия хроматографического разделения летучих токсических веществ, разработан и валидирован метод идентификации в моче летучих токсических веществ и количественного определения ацетона на основе технологии статического варианта парофазного анализа.

Заключение. Разработанный и валидированный метод идентификации в моче летучих токсических веществ позволил проводить эффективное хроматографическое разделение аналитов, определять количественное содержание ацетона и повысить в 2 раза эффективность выявления летучих токсических веществ в образцах мочи.

Ключевые слова: летучие токсические вещества, парофазный анализ, хроматографическое разделение, предел обнаружения, критерий приемлемости, валидация

Pavel V. Tchekhovski¹, Marina A. Gurina¹, Yury G. Pakhadnia¹, Irina D. Shileiko²✉,
Aliaksandr M. Chubukov³, Vladimir M. Sobolenko³, Olga M. Yukhnel³

¹ National Anti-Doping Laboratory, Minsk, Belarus

² Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

³ Minsk City Clinical Narcological Center, Minsk, Belarus

Headspace Analysis in the Study of Volatile Toxic Substances

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Pavel V. Tchekhovski – concept, study design, text writing; Marina A. Gurina – material collection, processing; Yury G. Pakhadnia – writing, editing; Irina D. Shileiko – study design, text writing, literature review; Aliaksandr M. Chubukov – concept, study design; Vladimir M. Sobolenko – material collection, processing; Olga M. Yukhnel – writing, editing.

Submitted: 27.01.2023

Accepted: 27.02.2023

Contacts: irina.shileiko@yandex.by

Abstract

Introduction. The results of chemical and toxicological analysis are largely determined by the quality of pre-analytical stage of the laboratory study. With regard to the study of volatile toxic substances in biological material, headspace analysis is considered to be an effective method of sample preparation.

Purpose. To substantiate scientifically and to work out a validated method for identification of volatile toxic substances and quantification of acetone in urine using the technology of a static version of headspace analysis.

Materials and methods. Gas-liquid chromatography with headspace analysis was used to study 41 urine samples from volunteers: 36 samples with analytes and/or internal standard added and 5 samples with no analytes or internal standard added.

Results. Conditions for chromatographic separation of volatile toxic substances were established; and a method for identifying volatile toxic substances in urine and quantifying acetone based on the technology of a static version of headspace analysis was developed and validated.

Conclusion. The developed and validated method for identifying volatile toxic substances in urine allowed efficient chromatographic separation of analytes, quantification of acetone, and contributed to a 2-fold increase in the efficiency of detecting volatile toxic substances in urine samples.

Keywords: volatile toxic substances, headspace analysis, chromatographic separation, detection limit, acceptance criterion, validation

■ ВВЕДЕНИЕ

Летучие токсические вещества (ЛТВ) – группа разных по химической структуре органических веществ, широко используемых в народном хозяйстве в качестве растворителей, антифризов, горючих материалов и сырья для получения большого количества разнообразных продуктов в ходе промышленного производства, выполнения научно-исследовательских работ и в быту [1]. В Республике Беларусь наиболее

частыми причинами интоксикации летучими органическими соединениями (ЛОС) являются этиловый спирт, другие одноатомные спирты, этиленгликоль, хлорированные углеводороды, а также органические растворители [2].

Актуальность проблемы выявления ЛТВ в биологических жидкостях вызвана и тем обстоятельством, что летучие органические растворители нередко употребляются преднамеренно с целью получения состояния одурманивания [1].

Нередко возникающая в медицинской практике потребность в освидетельствовании на предмет употребления летучих токсических веществ предъявляет особенно высокие требования к аналитической надежности диагностических технологий исследования пациентов. Известно, что конечные результаты выполнения химикотоксикологического анализа во многом предопределяются качеством осуществления преаналитического этапа лабораторного исследования, обычно состоящего в выделении из биологических жидкостей чужеродных веществ (ксенобиотиков) различной химической природы.

Применительно к области исследования в биологическом материале летучих органических веществ одним из весьма эффективных методов подготовки проб к выполнению процедуры аналитического определения ЛТВ считается статический вариант парофазного анализа (ПФА, *headspace analysis*), или газовая экстракция: лежащая в его основе технология состоит в газоэкстракционном выделении аналитов из жидких и твердофазных сред [3–6].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научно обосновать и разработать валидированный метод идентификации в моче летучих токсических веществ и количественного определения в ней ацетона с использованием технологии статического варианта парофазного анализа.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы мочи добровольцев (41 проба), из которых 36 содержали добавку аналитов и(или) внутреннего стандарта и 5 представляли собой холостые пробы (не содержащие искомым аналитов и внутреннего стандарта), а также модельные образцы, приготовленные на основе воды деионизированной с добавкой анализируемых летучих токсических веществ: ацетона, бензола, бутанола, бутилацетата, изобутанола, изопентанола, изопропанола, метанола, метилхлорида, метилэтилкетона, пентанола, тетрахлорэтилена, толуола, хлороформа, этанола, этилацетата, 1,2-дихлорэтана и градуировочные образцы в диапазоне концентраций ацетона от 5 мг/л до 420,1 мг/л.

Подготовка проб к аналитическому исследованию осуществлялась методом статического ПФА с использованием дозатора автоматического парофазного «ДАЖ-2М».

В качестве метода идентификации и количественного определения ЛТВ применялась газожидкостная хроматография, для чего использовался хроматограф «Хроматек-Кристалл 5000» с пламенно-ионизационным детектором (Россия).

Хроматографическое разделение аналитов осуществлялось на трех капиллярных колонках с неподвижными фазами разной полярности:

- колонка 1 – DB-VAX (полярная),
- колонка 2 – DB 624 (среднеполярная),
- колонка 3 – DB-FFAP (полярная).

Колонки 1 и 2 присоединялись к одному порту инжектора газового хроматографа, снабженному делителем пробы. Детектирование аналитов производилось при помощи трех пламенно-ионизационных детекторов, каждый из которых соединен с соответствующей колонкой.

Обработка данных осуществлялась в автоматическом режиме с использованием системы сбора и обработки данных «Хроматек Аналитик». Статистическая обработка – с помощью программного приложения RStudio в среде программирования R.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В основу использованной технологии исследования положена процедура разделения смеси компонентов равновесной паровой фазы, отобранной из замкнутого объема после термостатирования образца, методом газожидкостной хроматографии с последующим анализом компонентов с помощью пламенно-ионизационного детектора (ПИД) [1]. При этом учитывалось, что воспроизводимость результатов при использовании статического ПФА во многом зависит от точности поддержания температуры [1]. С этой целью для термостатирования образцов применялась парофазная приставка ДАЖ-2, позволяющая поддерживать постоянную температуру пробы на протяжении всего периода инкубирования.

В ходе исследования, ориентированного на валидацию метода, оценивались аналитические характеристики хроматографического анализа: селективность, предел обнаружения при качественном определении ЛТВ в моче, влияние матрицы, повторяемость, промежуточная прецизионность, калибровочная модель, правильность (при количественном определении ацетона), эффективность процесса и эффективность внутреннего стандарта.

Полученные результаты позволили валидировать разрабатываемый метод анализа.

Для оценки разделяющей способности хроматографических колонок определялись времена удерживания анализируемых ЛТВ на каждой колонке. Было установлено, что времена удерживания некоторых веществ на одной и той же колонке близки по значению, что не позволяет идентифицировать аналиты за счет наложения их хроматографических пиков. Времена удерживания аналитов на хроматографических колонках с разными неподвижными фазами представлены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, на колонке 1 не разделяются пики метиленхлорида (время удерживания – 3,132) и изопропанола (3,140), на колонке 2 – ацетона (2,783) и изопропанола (2,859), а также 1,2-дихлорэтана (4,928) и бензола (4,933), на колонке 3 – метиленхлорида (2,730) и этанола (2,740), а также 1,2-дихлорэтана (4,928) и бутилацетата (4,091). Эффективное хроматографическое разделение ЛТВ было получено при хроматографии аналитов последовательно на трех колонках.

Оценка селективности и предела обнаружения (ПО) базировалась на выполнении исследований проб трех видов:

- холостых (не содержащих искомым аналитов) образцов мочи добровольцев без добавки аналитов и внутреннего стандарта (BC) – Sel-ZeroBlank;
- холостых образцов мочи добровольцев без добавки аналитов, но с добавкой BC (пропилового спирта) – Sel-Blank;
- образец с добавкой аналита на уровне условно низкой концентрации, позволяющей определить абсолютное время удерживания, с добавкой BC – Sel-A-LL.

Таблица 1

Значения времен удерживания исследуемых аналитов на хроматографических колонках

Table 1

Retention times of the analyzed analytes on chromatographic columns

Аналиты	Колонка 1	Колонка 2	Колонка 3
Ацетон	2,205	2,783	1,933
Этилацетат	2,756	4,118	2,367
Метанол	2,859	1,929	2,449
Изопропанол	3,140	2,859	2,661
Метиленхлорид	3,132	3,111	2,730
Этанол	3,206	2,460	2,740
Толуол	4,429	7,809	2,835
Бензол	3,290	4,933	3,545
1,2-дихлорэтан	4,720	4,928	4,082
Бутилацетат	4,830	9,973	4,091
Изобутанол	5,131	4,748	4,289
Бутанол	6,153	5,495	5,045
Изопентанол	7,788	7,539	6,202
Пентанол	9,318	8,803	7,263

Сводные данные по оценке селективности и ПО приведены в табл. 2.

Как видно из представленных в табл. 2 данных, на хроматограммах холостых образцов сигнал по аналитическому каналу ВС отсутствует либо составляет не более 5% от интенсивности сигнала ВС в образце с добавкой аналита на уровне условно низкой концентрации, на хроматограммах образцов с добавкой ВС (без аналита) сигнал аналита отсутствует или составляет не более 1% от интенсивности относительного сигнала аналита в образце с его добавкой на уровне условно низкой концентрации, что свидетельствует о выполнении критериев приемлемости для селективности хроматографического процесса.

Расчет предела обнаружения (ПО) каждого аналита выполнен с использованием статистического подхода при анализе уровня фонового сигнала. Для этого с использованием данных анализа образца Sel-A-LL рассчитана концентрация PO_{Sel} , соответствующая наибольшему из двух значений сигнала I_{LOD} :

$$I_{LOD} = \bar{A} + 3,3\sigma,$$

$$I_{LOD} = 3,3\bar{A},$$

$$PO_{Sel} = C_A I_{LOD} / I_{Sel}$$

где $\bar{A}$ – среднее значение относительного сигнала аналита в образцах Sel-Blank;

σ – стандартное отклонение относительного сигнала аналита в образцах Sel-Blank;

C_A – значение концентрации аналита в образце Sel-A-LL;

I_{Sel} – значение относительного сигнала аналита в образце Sel-A-LL.



Таблица 2
Данные по оценке селективности и предела обнаружения при качественном определении летучих токсических веществ в моче
Table 2
Data on selectivity and limit of detection assessment in qualitative determination of volatile toxic substances in urine

Аналит	Детектор	Концентрация в образце Sel-A-LL, мг/л	Относительная величина сигнала аналита		Критерий приемлемости величины фонового сигнала, не более	Предел обнаружения аналита в моче, мг/л
			в образце Sel-A-LL	в образце Sel-Blank		
Ацетон	ПИД-1	79	0,180530	сигнал отсутствует	0,001805	0,80
	ПИД-2		0,189536	сигнал отсутствует	0,001895	0,80
	ПИД-3		0,210541	сигнал отсутствует	0,002105	0,80
Этилацетат	ПИД-1	90	0,562039	сигнал отсутствует	0,005620	0,09
	ПИД-2		0,609678	сигнал отсутствует	0,006097	0,09
	ПИД-3		0,585924	0,000568	0,005859	0,29
Метанол	ПИД-1	24	не разделен с пиком МЭК	–	–	–
	ПИД-2		0,004900	сигнал отсутствует	0,000049	0,30
	ПИД-3		не разделен с пиком МЭК	–	–	–
Метилэтилкетон (МЭК)	ПИД-1	80	не разделен с пиком метанола	–	–	–
	ПИД-2		0,317821	сигнал отсутствует	0,003178	0,80
	ПИД-3		не разделен с пиком метанола	–	–	–
Изопропанол	ПИД-1	79	не разделен с пиком метилхлорида	–	–	–
	ПИД-2		0,185203	сигнал отсутствует	0,001852	0,80
	ПИД-3		0,192309	сигнал отсутствует	0,001923	0,80
Метилхлорид	ПИД-1	40	не разделен с пиком изопропанола	–	–	–
	ПИД-2		0,205633	0,000416	0,002056	0,30
	ПИД-3		не разделен с пиком этанола	–	–	–

Продолжение таблицы 2

Аналит	Детектор	Концентрация в образце Sel-A-LL, мг/л	Относительная величина сигнала аналита		Критерий приемлемости величины фонового сигнала, не более	Предел обнаружения аналита в моче, мг/л
			в образце Sel-A-LL	в образце Sel-Blank		
Этанол	ПИД-1	0,004	0,171591	0,004847	0,001716	0,0001
	ПИД-2		0,165569	0,002848	0,001656	0,0002
	ПИД-3		не разделен с пиком метилхлорида	–	–	–
Бензол	ПИД-1	50	1,677994	сигнал отсутствует	0,016780	0,50
	ПИД-2		не разделен с пиком 1,2-дихлор-этана	–	–	–
	ПИД-3		1,662060	сигнал отсутствует	0,016621	0,50
Хлороформ	ПИД-1	60	0,191329	0,000249	0,001913	0,26
	ПИД-2		0,191734	сигнал отсутствует	0,001917	0,60
	ПИД-3		не разделен с пиком тетрахлорэтилена	–	–	–
Тетрахлорэтилен	ПИД-1	15	0,108863	0,000692	0,001089	0,31
	ПИД-2		0,105173	сигнал отсутствует	0,001052	0,20
	ПИД-3		не разделен с пиком хлороформа	–	–	–
Толуол	ПИД-1	26	2,076050	сигнал отсутствует	0,020760	0,30
	ПИД-2		2,040738	сигнал отсутствует	0,020407	0,30
	ПИД-3		2,029027	сигнал отсутствует	0,020290	0,30
1,2-дихлорэтан	ПИД-1	50	0,627536	сигнал отсутствует	0,006275	0,50
	ПИД-2		не разделен с пиком бензола	–	–	–
	ПИД-3		не разделен с пиком бутилацетата	–	–	–
Бутилацетат	ПИД-1	88	1,053473	сигнал отсутствует	0,010535	0,90
	ПИД-2		1,050982	сигнал отсутствует	0,010510	0,90
	ПИД-3		не разделен с пиком 1,2-дихлорэтана	–	–	–

Окончание таблицы 2

Аналит	Детектор	Концентрация в образце Sel-A-LL, мг/л	Относительная величина сигнала аналита		Критерий приемлемости величины фонового сигнала, не более	Предел обнаружения аналита в моче, мг/л
			в образце Sel-A-LL	в образце Sel-Blank		
Изобутанол	ПИД-1	80	0,223491	сигнал отсутствует	0,002235	0,80
	ПИД-2		0,221085	сигнал отсутствует	0,002211	0,80
	ПИД-3		0,233550	сигнал отсутствует	0,002335	0,80
Бутанол	ПИД-1	81	0,135628	сигнал отсутствует	0,001356	0,80
	ПИД-2		0,132990	сигнал отсутствует	0,001330	0,80
	ПИД-3		0,139627	0,000571	0,001396	1,09
Изопентанол	ПИД-1	81	0,230508	сигнал отсутствует	0,002305	0,80
	ПИД-2		двойной пик	–	–	–
	ПИД-3		0,237153	сигнал отсутствует	0,002372	0,80
Пентанол	ПИД-1	81	0,198858	сигнал отсутствует	0,001989	0,80
	ПИД-2		0,197694	сигнал отсутствует	0,001977	0,80
	ПИД-3		0,203275	сигнал отсутствует	0,002033	0,80

При отсутствии сигнала аналита в образцах Sel-Blank в качестве условного ПО аналита принималась концентрация, соответствующая 1% от концентрации данного аналита в образце Sel-A-LL.

Для установления характеристик аналитического метода при количественном определении ацетона были оценены такие параметры, как селективность, влияние матрицы, эффективность процесса и эффективность внутреннего стандарта, предел количественного определения (ПКО), калибровочная модель, повторяемость, промежуточная прецизионность, правильность.

Для оценки селективности исследовались следующие образцы:

- модельные образцы без добавки ацетона и ВС с использованием воды деионизированной – Sel-ZeroBlank-W;
- модельные образцы без добавки ацетона, но с добавкой ВС, с использованием воды деионизированной – Sel-Blank-W;
- модельный образец с добавкой ацетона на уровне условно низкой концентрации (30,1 мг/л), но позволяющей достоверно определить абсолютное время удерживания ацетона, приготовленный с использованием воды деионизированной – Sel-A-LL-W.

Приготовленные образцы проанализированы в условиях аналитической процедуры. Установлено выполнение критериев приемлемости: на хроматограммах образцов Sel-ZeroBlank-W сигнал по аналитическому каналу ВС отсутствует или составляет не более 5% от интенсивности сигнала ВС в образце Sel-A-W-LL, на хроматограммах образцов Sel-Blank-W сигнал по аналитическому каналу ацетона отсутствует или составляет не более 1% от интенсивности относительного сигнала аналита в образце Sel-A-LL.

Расчет ПКО ацетона выполнен с использованием статистического подхода при анализе уровня фонового сигнала. Для этого на основании результатов анализа образца Sel-A-LL-W рассчитана концентрация (PKO_{Sel}), соответствующая наибольшему из двух значений сигнала I_{LOQ} :

$$I_{LOQ} = \bar{A} + 10\sigma,$$

$$I_{LOQ} = 10\bar{A},$$

$$PKO_{Sel} = C_A I_{LOQ} / I_{Sel}$$

где $\bar{A}$ – среднее значение относительного сигнала аналита в образцах Sel-Blank-W;
 σ – стандартное отклонение относительного сигнала аналита в образцах Sel-Blank-W;

C_A – значение концентрации аналита в образце Sel-A-LL-W;

I_{Sel} – значение относительного сигнала аналита в образце Sel-A-LL-W.

Рассчитанное значение наименьшего количества ацетона в моче, которое можно количественно определить с соответствующей прецизионностью и правильностью (ПКО), составило 1,8 мг/л.

Для создания калибровочной модели приготавливались градуировочные образцы на основе деионизированной воды в диапазоне концентраций ацетона от 5 мг/л до 420,1 мг/л и исследовались в условиях аналитической процедуры.

На основании полученных результатов проведена оценка на наличие гетероскедастичности (неоднородности наблюдений) в данных, осуществлен подбор оптимального весового коэффициента путем анализа вариаций и оптимальной калибровочной модели с помощью F-теста, а также выполнена валидация полученной модели с помощью теста на нормальность распределения нормированных (стандартизованных) остатков с использованием теста Крамера – фон Мизеса [8, 9]. Доказано, что оптимальная калибровочная модель представляет собой линейную модель с весовым коэффициентом $1/x^2$; коэффициент корреляции – более 0,99.

В ходе определения оптимальной калибровочной модели оценивалось влияние матрицы путем сравнения коэффициентов наклона уравнений линейной регрессии [10] для серий градуировочных образцов, приготовленных с использованием деионизированной воды и мочи. Поправочный коэффициент k рассчитан по формуле:

$$k = \frac{b_w}{b_c},$$

где b_w – коэффициент наклона уравнений линейной регрессии для серии градуировочных образцов, приготовленных с использованием деионизированной воды;

b_c – взвешенный коэффициент наклона уравнений линейной регрессии для 3 различных серий градуировочных образцов, приготовленных с использованием мочи [10].

Величина коэффициента k составила 1,042.

Таким образом, расчет конечного результата (C) при рутинном количественном определении ацетона в моче следует производить с учетом поправочного коэффициента по формуле:

$$C = 1,042 \times C_0,$$

где C – количественное содержание ацетона в пробе мочи,

C_0 – значение концентрации ацетона в моче, полученное с использованием параметров уравнения линейной регрессии для серии градуировочных образцов.

Как отмечалось, эффективность хроматографического процесса подвержена воздействию таких факторов, как влияние матрицы (вариация аналитического сигнала, обусловленная различной степенью ионной супрессии и ионной индукции в различных образцах матрицы данного типа) и степени экстракции (ее вариации в различных образцах матрицы данного типа). Определение эффективности процесса по приведенной ниже схеме позволяет оценить одновременно относительный матричный эффект и вариацию, обусловленную степенью экстракции [11].

Для оценки эффективности процесса (влияние матрицы и степени экстракции) для каждого из двух уровней концентраций ацетона (5 мг/л и 200 мг/л) приготавливались следующие образцы:

- модельные образцы на основе мочи добровольцев с заданной добавкой ацетона и ВС – PreExt;
- модельный образец с заданной добавкой ацетона и ВС, приготовленный аналогично образцам PreExt с использованием деионизированной воды вместо мочи – NS;

- холостые образцы мочи добровольцев без добавки ацетона, но с добавкой ВС (данные образцы использованы для поправки на эндогенное содержание ацетона в моче при проведении расчетов для образцов PreExt).

Оценка полученных результатов производилась на основании расчета коэффициента вариации (CV) относительного сигнала ацетона – отношения абсолютного аналитического сигнала ацетона (A) к абсолютному аналитическому сигналу внутреннего стандарта (BC).

В качестве критериев приемлемости использовались следующие:

1. CV в образцах PreExt должен составлять не более 10%: $CV(A/BC_PreExt) \leq 10\%$.
2. CV относительного сигнала ацетона в образцах PreExt не должен превышать CV относительного сигнала ацетона в образцах NS более чем в три раза: $CV(A/BC_PreExt) \leq 3CV(A/BC_NS)$.

Проверка данного критерия позволяет оценить общую эффективность процедуры пробоподготовки по удалению мешающих компонентов биологической матрицы.

3. Критерий эффективности ВС: CV относительного сигнала ацетона в образцах PreExt не должен превышать CV абсолютного сигнала ацетона и ВС в данных образцах PreExt:

- $CV(A/BC_PreExt) < CV(A_PreExt)$;
- $CV(A/BC_PreExt) < CV(BC_PreExt)$.

Полученные в ходе исследования результаты приведены в табл. 3.

Как видно из приведенных в табл. 3 данных, коэффициент вариации относительного сигнала ацетона соответствует установленным критериям приемлемости, что свидетельствует об эффективности процедуры пробоподготовки.

Таблица 3
Соответствие влияния матрицы, эффективности процесса и эффективности внутреннего стандарта при количественном определении ацетона в моче критериям приемлемости
Table 3
Conformity of matrix influence, process efficiency and internal standard performance in quantitative determination of acetone in urine with acceptance criteria

Концентрация ацетона в моче, мг/л	Параметр	Значение CV	Критерий приемлемости	Соответствие критерию приемлемости
5	CV (A/BC_PreExt)	4,93%	$\leq 10\%$	соответствует
			$\leq 3CV(A/BC_NS)$ ($\leq 16,7\%$)	соответствует
			$< CV(A_PreExt)$ ($< 6,0\%$)	соответствует
			$< CV(BC_PreExt)$ ($< 7,1\%$)	соответствует
200	CV (A/BC_PreExt)	4,32%	$\leq 10\%$	соответствует
			$\leq 3CV(A/BC_NS)$ ($\leq 10,0\%$)	соответствует
			$< CV(A_PreExt)$ ($< 8,3\%$)	соответствует
			$< CV(BC_PreExt)$ ($< 5,6\%$)	соответствует

С целью оценки повторяемости, промежуточной прецизионности и правильности для каждого из двух уровней концентраций ацетона (5 мг/л и 200 мг/л) приготавливались следующие образцы:

- модельные образцы в 2 повторах, каждый с добавкой ацетона и ВС, приготовленные на основе холостых образцов мочи добровольцев – Prec;
- калибровочные образцы в диапазоне концентраций ацетона от 5,0 до 420,1 мг/л (6 точек в одном повторе) с использованием деионизированной воды;
- холостые образцы с использованием мочи добровольцев – без добавки ацетона, но с добавкой ВС (данные образцы использованы для поправки на эндогенное содержание ацетона в моче при проведении расчетов для образцов Prec).

Образцы исследованы в условиях аналитической процедуры в трех повторах в течение трех дней с ежедневной заменой оператора.

По полученным данным на каждом уровне концентрации ацетона в моче рассчитаны следующие параметры:

- 1) стандартное отклонение повторяемости (внутрисерийной прецизионности) s_r (в соответствии с СТБ ИСО 5725-2-2002, п. 7.4.5.3 [12]):

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{2p} \sum (y_{i1} - y_{i2})^2},$$

где p – общее количество образцов Prec (без учета повторных измерений; $p=15$ для описанной выше схемы);

$y_{i1} - y_{i2}$ – результаты повторных измерений для данного образца Prec;

- 2) предел повторяемости r ; данное значение используют при рутинных исследованиях для проверки повторяемости при повторных анализах образцов контроля качества (КК) – в рамках проверки приемлемости аналитической серии; для 2 повторных анализов образца КК значение рассчитано следующим образом [13]:

$$r = 2,8s_r \geq (X_{\max} - X_{\min}),$$

где $X_{\max}, X_{\min}$ – большее и меньшее из полученных значений концентрации ацетона в образце КК;

- 3) стандартное отклонение межсерийной прецизионности s_g (СТБ ИСО 5725-2-2002, п. 7.4.5.3) [12];
- 4) стандартное отклонение промежуточной прецизионности s_w (СТБ ИСО 5725-2-2002, п. 7.4.5.5 [12]):

$$s_w = \sqrt{s_r^2 + s_g^2},$$

- 5) смещение Δ [14]:

$$\Delta = \frac{\sum n_i \bar{\Delta}_i}{\sum n_i},$$

где $\bar{\Delta}_i$ – среднее смещение для 2 повторов, рассчитанное для данного образца Prec;

n_i – число повторных измерений для данного образца Prec ($n_i=2$).

- 6) стандартная неопределенность смещения s_Δ [14]:

$$s_{\Delta} = \sqrt{u_{\text{ref}}^2 + \left(\frac{s_{\text{bias}}}{\sqrt{n}}\right)^2},$$

где u_{ref} – неопределенность приписанного значения концентрации ацетона в образцах Prec;

$$\frac{s_{\text{bias}}}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{1}{2p} \frac{\sum (\Delta_{i1} - \Delta_{i2})^2}{n}}, \quad n=30 \text{ для описанной выше схемы};$$

7) стандартная неопределенность для данного уровня концентрации ацетона в моче u :

$$u = \sqrt{s_w^2 + \Delta^2 + s_{\Delta}^2}.$$

Полученные данные приведены в табл. 4.

Как следует из рассмотрения приведенных в табл. 4 данных, для концентрации ацетона в моче 5 мг/л рассчитанное стандартное отклонение промежуточной

Таблица 4

Результаты определения повторяемости, промежуточной прецизионности, правильности, неопределенности измерений при количественном определении ацетона в моче

Table 4

Results of repeatability, intermediate precision, accuracy, and measurement uncertainty in quantitative determination of acetone in urine

Концентрация ацетона в моче, мг/л	Параметр		Полученное значение
5	S_r , мг/л		0,149
	r , мг/л		0,42
	s_w	мг/л	0,895
		%	18
	Δ	мг/л	0,757
		%	15
	s_{Δ}		0,76
	u	мг/л	1,17
		%	23
200	S_r , мг/л		3,91
	r , мг/л		11,0
	s_w	мг/л	10,75
		%	5,4
	Δ	мг/л	9,27
		%	4,6
	s_{Δ}		9,3
	u	мг/л	14,2
		%	7,1

прецизионности составило 18%, смещение – 15%, что соответствует критерию приемлемости для концентрации аналита в пределах ПКО: $\leq 20\%$. Для концентрации ацетона в моче 200 мг/л рассчитанное стандартное отклонение промежуточной прецизионности составило 5,4%, смещение – 4,6%, что также соответствует критерию приемлемости для s_w и Δ при данной концентрации аналита в пробе: $\leq 10\%$.

Стандартная неопределенность измерений u (в %) в условиях валидируемой методики составила:

- для диапазона концентраций ацетона от 5 мг/л до 200 мг/л:

$$u = 23,83 - 0,0836C_A,$$

где C_A – найденное значение концентрации ацетона в испытуемом образце;

- для диапазона концентраций ацетона свыше 200 мг/л – 7%.

Метод газожидкостной хроматографии в сочетании со статическим парофазным анализом был апробирован в централизованной химико-токсикологической лаборатории УЗ «Минский городской клинический наркологический центр» (ЦХТЛ УЗ «МГКНЦ»).

Исследовались образцы мочи на предмет установления наличия в них ЛТВ: ацетона, бензола, бутилацетата, изобутанола, метилхлорида, метилэтилкетона, тетрахлорэтилена, толуола, хлороформа, этилацетата, 1,2-дихлорэтана. Исследовано 113 образцов мочи, ЛТВ (ацетон, толуол) выявлены в 26 пробах, что составило 23% общего количества исследованных объектов. Ранее в ЦХТЛ УЗ «МГКНЦ» использовался метод выявления ЛТВ с термостатированием проб мочи в сушильном шкафу с последующим хроматографическим разделением на набивной колонке с использованием газожидкостного хроматографа «Кристалл 2000» (РФ). Результативность данного метода оказалась ниже: из 67 исследованных образцов мочи для обнаружения ЛТВ в 6 пробах выявлен ацетон (9% общего количества исследованных образцов).

Таким образом, использование метода газовой хроматографии в сочетании с ПФА позволило в 2 раза повысить эффективность выявления ЛТВ в образцах мочи.

■ ВЫВОДЫ

1. В ходе исследования установлено, что для повышения эффективности хроматографического процесса разделения ЛТВ (ацетона, бензола, бутанола, бутилацетата, изобутанола, изопентанола, изопропанола, метанола, метилхлорида, метилэтилкетона, пентанола, тетрахлорэтилена, толуола, хлороформа, этанола, этилацетата, 1,2-дихлорэтана) методом газожидкостной хроматографии его целесообразно осуществлять последовательно на трех колонках с разными неподвижными фазами.

Достаточно высокую разрешающую способность для хроматографического разделения ЛТВ показали капиллярные колонки DB-VAX, DB 624 и DB-FFAP.

2. Метод газожидкостной хроматографии в сочетании со статическим парофазным анализом является специфичным для качественного определения ЛТВ в образцах мочи, поскольку обладает высокой селективностью (избирательностью) и приемлемыми значениями предела обнаружения: минимальное содержание, при котором возможно выявление анализируемых веществ с заданной достоверной вероятностью, составляет от 0,001 мг/л для этанола до 1,09 мг/л для бутанола.

3. Оценка валидационных характеристик метода ПФА показала соответствие данного метода критериям приемлемости по эффективности процесса, пределу количественного определения, повторяемости, промежуточной прецизионности, правильности для количественного определения ацетона. В ходе исследования рассчитан поправочный коэффициент k ($k=1,042$), позволяющий исключить влияние матрицы на результат при количественном определении ацетона в моче.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kamyshnikov V.S., Shileiko I.D., Chubukov A.M. et al. (2016) *Clinical and laboratory diagnostics of the use of psychoactive substances*. Minsk: Adukatsyya i vykhavanne. 367 p. (In Russian)
2. Chubukov A.M., Sobolenko V.M., Turtsevich A.M. et al. (2021) Study of the Prevalence of Volatile Toxic Substances among Drug Users in the Republic of Belarus and the Russian Federation. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*, vol. 10(4), pp. 405–411. (In Russian). DOI: 10.34883/PI.2021.10.4.001.
3. Rodinkov O.V. (2021) Modern Trends in the Development of Headspace Gas Chromatography Analysis. *Analytika*, vol. 11(1), pp. 30–39. DOI: 10.22184/2227-572X.2021.11.1.30.39 (In Russian).
4. Rodinkov O.V., Bugaichenkov A.S., Moskvina L.N. (2020) Static headspace analysis and its state of the art. *J of Analytical Chemistry*, vol. 75(1), pp. 3–23. (In Russian)
5. Poole C., Mester Z., Miró M. et al. (2016) Extraction for analytical scale sample preparation (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, vol. 88(7), pp. 649–687. DOI 10.1515/pac-2015-0705.
6. Soria, A.C., Garcha-Sarriy M.J., Sanz M.L. (2015) Volatile sampling by headspace techniques. *Trends Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 85–99. DOI: 10.1016/j.trac.2015.04.015.
7. Davletbaeva L.R., Israfilov A.G., Nigmatullin R.R. et al. (2005) Validation of analytical research methods. Ufa: *Meditsinskie immunobiologicheskie preparaty v XXI veke razrabotka, proizvodstvo i primeneniye. Sbornik trudov Vserossiiskoi konferentsii*, pp. 34–47. (In Russian).
8. Desharnais B., Camirand-Lemyre F., Mireault P. et al. (2017) Procedure for the Selection and Validation of a Calibration Model I – Description and Application. *J of Analytical Toxicology*, vol. 41, pp. 261–268. DOI: 10.1093/jat/bkx001.
9. Desharnais B., Camirand-Lemyre F., Mireault P. et al. (2017) Procedure for the Selection and Validation of a Calibration Model II – Theoretical Basis. *J of Analytical Toxicology*, vol. 41, pp. 269–276. DOI: 10.1093/jat/bkx002.
10. Jerrold H. Zar. (2010) *Biostatistical analysis*. 5th ed. New Jersey: Upper Saddle River. 944 p.
11. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. (2003) Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 301–3030. DOI: 10.1021/ac020361s.
12. STB ISO 5725-2-2002 Accuracy (correctness and precision) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for determining the repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Minsk: BeLGIM. 68 p. (In Russian).
13. STB ISO 5725-6-2002 Accuracy (correctness and precision) of measurement methods and results. Part 6. Using precision values in practice. Minsk: BeLGIM. 48 p. (In Russian).
14. EDQM PA/PH/OMCL (18) 151 R1 CORR, Annex 2.3: Use of Certified Reference Materials for the Estimation of Measurement Uncertainty.