

ЭТАЛОНЫ

Научная статья

УДК 006.015.5:547

<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2024-20-4-5-19>



Совершенствование Государственного первичного эталона в области органического анализа ГЭТ 208

А. Ю. Михеева  , Е. М. Лопушанская, А. И. Крылов

ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д. И. Менделеева»,
г. Санкт-Петербург, Россия
 a.mikheeva@vniim.ru

Аннотация: В условиях стремительного развития российской фармацевтической промышленности возникла острая необходимость совершенствования Государственного первичного эталона единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации органических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии с изотопным разбавлением и гравиметрии (ГЭТ 208).

В результате проведенного в 2023 г. совершенствования ГЭТ 208 в состав эталона включена новая установка на основе метода высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения. Таким образом были расширены функциональные возможности ГПЭ в соответствии с актуальными требованиями отечественной промышленности и в целях успешного участия России в международных сличениях в области органического анализа в среднесрочной перспективе.

В статье представлены материалы по исследованию возможностей новой установки для решения измерительных задач в области органического анализа, описаны конкретные аналитические техники и методы измерений, приведены экспериментальные данные и обобщенные результаты. На основании выполненных исследований улучшены метрологические характеристики ГЭТ 208 в части воспроизведения единиц массовой (молярной) доли основного компонента в чистых органических веществах, массовой доли органических компонентов в растворах и материалах.

Совершенствование ГЭТ 208 позволило создать научный, методический и приборный задел для воспроизведения единиц величин широкой номенклатуры органических соединений.

Ключевые слова: Государственный первичный эталон, органический анализ, метод массового баланса, масс-спектрометрия высокого разрешения, чистые органические вещества, активные фармацевтические субстанции

Принятые сокращения: ГПЭ – Государственный первичный эталон (он же эталон, ГЭТ 208); ОА – органический анализ; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГХ – газовая хроматография; МС – масс-спектрометр; ПИД – пламенно-ионизационный детектор; Q/TOF (Quadrupole / Time-of-Flight) – тандемный квадрупольно-времяпролетный масс-спектрометрический детектор; ESI (Electrospray Ionisation) – ионизация электроспрей; DAD (Diode Array Detector) – ультрафиолетовый детектор на основе диодной матрицы; ОК – основной компонент; ЧВ – чистое органическое вещество; АФС – активная фармацевтическая субстанция; ОТС.НCl – окситетрациклина гидрохлорид; МБ – массовый баланс; МИ – методика измерений; СО – стандартный образец.

Ссылка при цитировании: Михеева А. Ю., Лопушанская Е. М., Крылов А. И. Совершенствование Государственного первичного эталона в области органического анализа ГЭТ 208 // Эталоны. Стандартные образцы. 2024. Т. 20, № 4. С. 5–19. <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2024-20-4-5-19>.

Статья поступила в редакцию 10.09.2024; одобрена после рецензирования 30.10.2024; принята к публикации 25.12.2024.

MEASUREMENT STANDARDS

Research Article

Improvement of the State Primary Standard in the Field of Organic Analysis GET 208

Alena Yu. Mikheeva  , Elena M. Lopushanskaya, Anatoliy I. Krylov

D. I. Mendeleev Institute for Metrology, St. Petersburg, Russia

 a.mikheeva@vniim.ru

Abstract: In the context of the rapid development of the Russian pharmaceutical industry, there is an urgent need to improve the State Primary Standard for the units of mass (molar) fraction and mass (molar) concentration of organic components in liquid and solid substances and materials based on liquid and gas chromatography-mass spectrometry with isotope dilution and gravimetry (GET 208).

As a result of the improvement of GET 208 carried out in 2023, a new installation based on the high-performance liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry method was included in the standard. Thus, the functionality of the GPE was expanded in accordance with the current requirements of the domestic industry and for the purpose of Russia's successful participation in international comparisons in the field of organic analysis now and in the medium term.

The article presents materials on the study of the capabilities of the new installation for solving various measurement problems in the field of organic analysis, describes specific analytical techniques and measurement methods, and provides experimental data and summarized results. Based on the completed studies, the metrological characteristics of GET 208 have been improved in terms of reproducing units of mass (molar) fraction of the main component in pure organic substances, mass fraction of organic components in solutions and materials.

Improvement of GET 208 made it possible to create a scientific, methodological and instrumental basis for reproducing measurement units for a wide range of organic compounds.

Keywords: State Primary Standard, organic analysis, mass balance method, high-resolution mass spectrometry, pure organic substances, active pharmaceutical substances

Abbreviations used: SPS – State Primary Standard (also known as GET 208 standard); OA – organic analysis; HPLC – high performance liquid chromatography; GC – gas chromatography; MS – mass spectrometer; FID – flame ionization detector; Q/TOF (Quadrupole / Time-of-Flight) – tandem quadrupole-time-of-flight mass spectrometric detector; ESI – electrospray ionisation; DAD (Diode Array Detector) – ultraviolet diode detector; MC – main component; PS – pure substance; APS – active pharmaceutical substance; OTC.HCl – oxytetracycline hydrochloride; MB – mass balance; MP – measurement procedure; RM – reference material.

For citation: Mikheeva A. Yu., Lopushanskaya E. M., Krylov A. I. Improvement of the State Primary Standard in the field of organic analysis GET 208. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2024;20(4):5–19. (In Russ.). <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2024-20-4-5-19>.

The article was submitted 10.09.2024; approved after reviewing 30.10.2024; accepted for publication 25.12.2024.

Введение

ГПЭ единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации органических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии с изотопным разбавлением и гравиметрии создан в 2014 году¹.

В 2019 г. ГЭТ 208 был усовершенствован², в результате область применения эталона была расширена на специфическую гибридную группу веществ, имеющих в составе молекулы органическую часть и неорганический гетероатом – элементоорганические соединения, что позволило решить метрологическую составляющую задачи по измерению элементоорганических компонентов в жидких и твердых матрицах природного и антропогенного происхождения

В 2023 г. совершенствование ГЭТ 208 было направлено на расширение функциональных возможностей ГПЭ, удовлетворение актуальных требований отечественной промышленности и народного хозяйства и создание условий для успешного участия России в международных сличениях в области органического анализа в среднесрочной перспективе. Состав эталона был расширен за счет новой установки на основе метода ВЭЖХ / масс-спектрометрии высокого разрешения, оснащенной детекторами

Q/TOF и DAD, что обеспечило ГЭТ 208 потенциальную возможность расширить компетенции в части идентификации органических компонентов, определения чистоты органических веществ и выполнения высокоточных измерений содержания органических компонентов в растворах и материалах условно первичным методом масс-спектрометрии с изотопным разбавлением [1]. Внешний вид и состав установки представлены на рис. 1.



Рис. 1. Внешний вид и состав установки: хроматограф жидкостный Agilent 1260 Infinity II LC с детектором 1260 DAD WR, хроматограф жидкостный Agilent 1290 Infinity II LC с тандемным квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором Agilent Q-TOFLC/MS6530

Fig. 1. Appearance and composition of the installation: Agilent 1260 Infinity II LC liquid chromatograph with 1260 DAD WR detector, Agilent 1290 Infinity II LC liquid chromatograph with Agilent Q-TOFLC/MS6530 tandem quadrupole-time-of-flight mass spectrometric detector

Цель исследования – изучить возможности нового аналитического оборудования в составе эталона на примере выбранных в качестве моделей активных фармацевтических субстанций и установить метрологические характеристики усовершенствованного ГПЭ ГЭТ 208.

Материалы и методы

В области ОА метрологическая прослеживаемость формируется на основе чистых органических веществ, единица величины «массовая

¹ Приказ Росстандарта № 125 от 29.01.2015 «Об утверждении Государственного первичного эталона единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации органических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии с изотопным разбавлением и гравиметрии».

² Приказ Росстандарта № 3390 от 27.12.2019 «Об утверждении Государственного первичного эталона единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации органических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии с изотопным разбавлением и гравиметрии».

доля основного компонента в чистом органическом веществе» обеспечивает прослеживаемость к основной единице Международной системы единиц – молю [2–6]. В свою очередь, первый и обязательный этап процедуры воспроизведения единицы величины – идентификация (или подтверждение идентичности) основного компонента. Выбор метода (или методов) идентификации зависит от физико-химических свойств и индивидуальных особенностей органических компонентов.

До 2023 г. состав ГПЭ включал оборудование, реализующее метод газовой хроматографии/масс-спектрометрии, которое позволяет успешно решать задачи по идентификации термостабильных и летучих органических соединений. Работа с нелетучими и/или термолабильными и/или «тяжелыми» (более 500 а. е. м.) органическими компонентами предполагает использование других аналитических методов. Доля такого рода соединений составляет примерно 80 % в общей номенклатуре органических веществ, к ним относятся современные пестициды, аминокислоты, витамины, микотоксины, гормоны и т. д. Отдельную и крайне разнообразную совокупность органических компонентов образуют фармацевтические субстанции, которые объединены по признаку назначения, но относятся к различным химическим классам и группам с разными базовыми физико-химическими свойствами. Отметим, что фармацевтическая отрасль является одной из ключевых на мировом рынке и в структуре национальной экономики России, и в настоящий момент направление исследований лекарственных средств особенно актуально и востребовано в условиях действующих санкций и ограничений³.

По этой причине в качестве моделей для изучения возможностей новой установки был выбран ряд АФС, что обеспечило представительность выборки и позволило по результатам

³ Постановление Правительства РФ от 18.02.2022 № 208 «О предоставлении субсидии из федерального бюджета автономной некоммерческой организации «Агентство по технологическому развитию» на поддержку проектов, предусматривающих разработку конструкторской документации на комплектующие изделия, необходимые для отраслей промышленности». Дополнение – Постановление Правительства РФ от 14.04.2022 № 653.

исследований сделать обоснованные выводы для широкого круга органических соединений.

Дизайн исследований был сформирован таким образом, чтобы изучить характеристики нового оборудования для решения основных задач органического анализа: 1) идентификации (подтверждения идентичности) ОК в ЧВ; 2) определения массовой доли ОК в ЧВ; 3) измерения органических компонентов в матрицах различного типа.

Исследования были выполнены на оборудовании, включенном в состав ГПЭ ГЭТ 208.

Для измерений чистоты ОТС.НС1 был разработан и аттестован документ «Методика характеристики чистого вещества. Окситетрациклина гидрохлорид» МХ–(Хд 4.092.000–068)-2023⁴.

Для измерений содержания метронидазола в пищевой матрице были разработаны и аттестованы документы «Методика измерений массовой доли метронидазола в лиофилизированных мясных продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/танDEMной масс-спектрометрии с изотопным разбавлением» МИ 023-ССQM K180–2023⁵ и «Методика измерений массовой доли метронидазола в лиофилизированных мясных продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/танDEMной масс-спектрометрии высокого разрешения с изотопным разбавлением» МИ 024-ССQM K180–2023⁶ (далее – МИ).

Перечислим оборудование и материалы:

– ГЭТ 208-2019 Государственный первичный эталон единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации органических компонентов в жидких и твердых

⁴ Методика характеристики чистого вещества. Окситетрациклина гидрохлорид. МХ–(Хд 4.092.000–068)-2023, методическая документация ГЭТ 208.

⁵ Методика измерений массовой доли метронидазола в лиофилизированных мясных продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/танDEMной масс-спектрометрии с изотопным разбавлением МИ 023-ССQM K180–2023, методическая документация ГЭТ 208.

⁶ Методика измерений массовой доли метронидазола в лиофилизированных мясных продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/танDEMной масс-спектрометрии высокого разрешения с изотопным разбавлением МИ 024-ССQM K180–2023, методическая документация ГЭТ 208.

веществах и материалах на основе жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии с изотопным разбавлением и гравиметрии;

– хроматограф жидкостный Agilent 1260 Infinity II LC с детектором на основе диодной матрицы 1260 DAD WR (производитель Agilent Technologies, Германия);

– хроматограф жидкостный Agilent 1290 Infinity II LC с тандемным масс-спектрометрическим детектором Agilent Q-TOFLC/MS6530 (производитель Agilent Technologies, США);

– чистые органические вещества АФС: циклосерин, тиоктовая кислота, клотримазол, гидрокартизона ацетат, спиралактон, фолиевая кислота, бозутиниба моногидрат, велпатасвир, аторвастатин кальция тригидрат с массовой долей основного компонента не менее 94 %;

– чистое органическое вещество окситетрациклина гидрохлорид с массовой долей окситетрациклина не менее 80 %;

– чистое органическое вещество метронидазол (производитель Hubei Hongyuan Pharmaceutical Technology Co. Ltd., заявленная чистота – 99,9 %), аттестованное значение массовой доли ОК в ЧВ – 99,93 %, расширенная неопределенность (при $k=2$ и $P=0,95$) – 0,02 %;

– чистое изотопно-меченое органическое вещество метронидазол – $^{13}\text{C}_2$, $^{15}\text{N}_2$ с массовой долей основного компонента 99,3 % (производитель Supelco, кат. № 32744).

Результаты и обсуждение

Подтверждение идентичности ОК в ЧВ

В части идентификации ОК в ЧВ исследования включали АФС (табл. 1), для которых были подобраны оптимальные условия измерений и выполнено подтверждение идентичности основного компонента методом ВЭЖХ-Q/TOF (Agilent Q-TOF LC/MS6530) или ВЭЖХ-МС/МС (Agilent 6460 Triple Quad) по фрагментарному масс-спектру вещества в режиме тандемной масс-спектрометрии или на основании значения точной массы молекулярного иона основного компонента. Примеры положительной идентификации представлены на рис. 2, 3 и 4.

Рабочий масс-спектр образца спиролактона, изображенный на рис. 2, хорошо согласуется с данными специализированной масс-спектральной библиотеки⁷ – совпадение зарегистрированного и библиотечного масс-спектров составляет 94 %, что позволяет считать результат идентификации основного компонента положительным.

На рис. 3 представлен фрагментарный масс-спектр образца аторвастатина кальция

⁷ Библиотека масс-спектров «The Agilent Veterinary Drug Personal Compound Database and Library (PCDL) for TOF or Q-TOF LC/MS systems» / «The MassHunter METLIN Metabolite PCD (Personal Compound Database) and PCDL (Personal Compound Database and Library)».

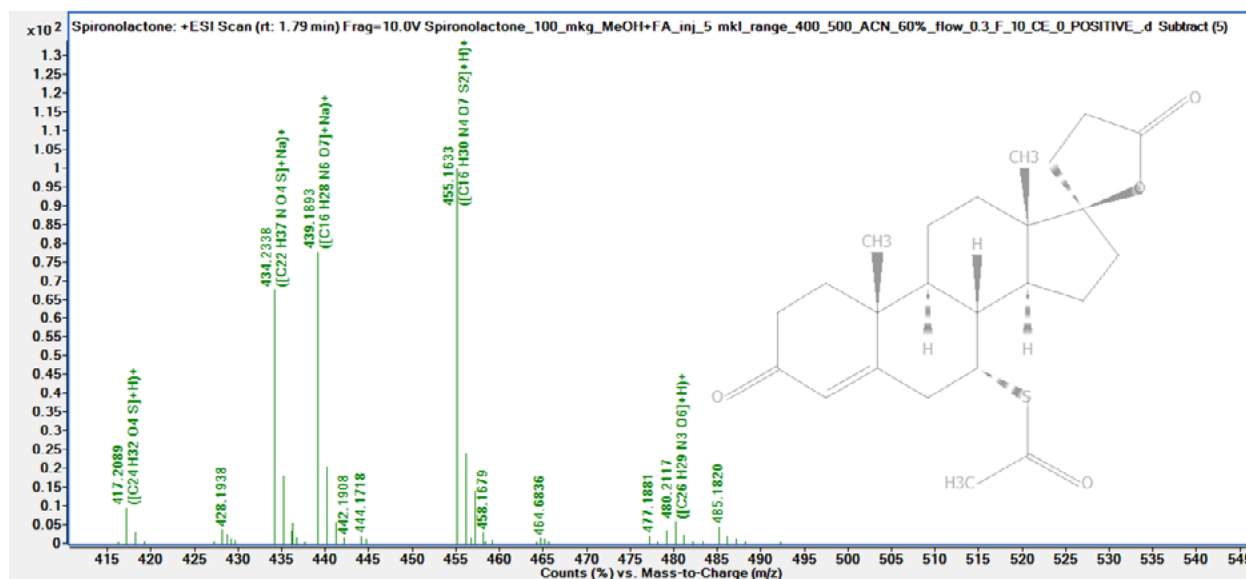
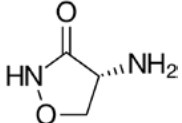
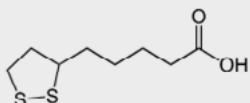
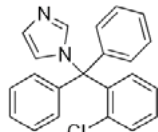
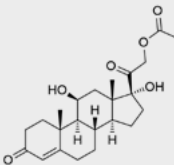
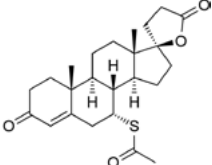
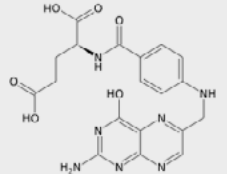
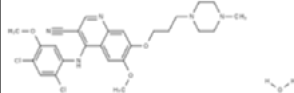
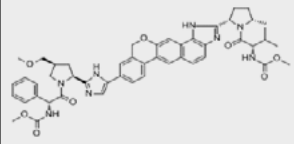
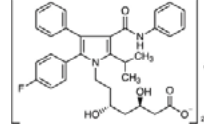


Рис. 2. Фрагментарный масс-спектр в режиме ESI(+) образца спиролактона

Fig.2. Fragmentary mass spectrum of a spironolactone sample in ESI(+) mode

Таблица 1. Перечень и базовые характеристики активных фармацевтических субстанций
Table 1. List and basic characteristics of active pharmaceutical substances

Название АФС	Фармацевтическая группа	Брутто-формула	Молярная масса, г/моль	Структурная формула
Циклосерин	Антибиотик	$C_3H_6N_2O_2$	102,09	
Тиоктовая кислота	Антиоксидант	$C_8H_{14}O_2S_2$	206,3	
Клотримазол	Противогрибковый препарат	$C_{22}H_{17}ClN_2$	344,8	
Гидрокортизона ацетат	Глюкокортикостероид	$C_{23}H_{32}O_6$	404,5	
Спиронолактон	Стероид	$C_{24}H_{32}O_4S$	416,6	
Фолиевая кислота	Витамин группы В	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	441,4	
Бозутиниба моногидрат	Противоопухолевый препарат	$C_{26}H_{31}Cl_2N_5O_4$	546,6	
Велпатасвир	Противовирусный препарат	$C_{49}H_{54}N_8O_8$	883,0	
Аторвастатин кальция тригидрат	Корректор липидных нарушений	$[C_{33}H_{34}FN_2O_5]_2 \cdot Ca \cdot 3H_2O$	1209,4	

тригидрата, который подтверждает структуру органической части молекулы.

Идентификацию основного компонента в бозутиниба моногидрате выполняли по значению точной массы молекулярного иона (рис. 4), за критерий идентификации приняли совпадение зарегистрированного значения m/z молекулярного иона с теоретически рассчитанным (допустимое расхождение – не более 5 ppm [7]). Органическая часть молекулы бозутиниба моногидрата – бозутиниб, фрагмент $[C_{26}H_{29}Cl_2N_5O_3]$ с молярной массой 530,45356 г/моль (атомная масса Cl принята равной природному изотопному значению 35,4527 а. е. м.). Зарегистрированная точная масса m/z 530,1728 соответствует протонированному молекулярному иону бозутиниба $[(C_{26}H_{29}Cl_2N_5O_3)+H]^+$ (принята в расчет атомная масса изотопа ^{35}Cl 34,9688 а. е. м.). Кроме того, в спектре присутствует изотопный кластер, характерный для хлорсодержащих молекул, что косвенно также подтверждает идентичность композиции.

Измерение массовой доли ОК в ЧВ

Возможности новой установки для целей определения чистоты органических веществ были исследованы на примере солеобразующего

органического вещества окситетрациклина гидрохлорида (ОТС.HCl)^{8, 9}, которое относится к группе тетрациклинов – антибиотиков широкого спектра действия и используется для лечения опасных инфекций дыхательных и мочевыводящих путей¹⁰. Поскольку существует потенциальный риск для здоровья потребителя при длительном воздействии низких уровней антибиотиков, во многих странах действуют программы мониторинга на наличие остатков тетрациклинов в пищевых продуктах животного происхождения (мясо, рыба, молоко, яйца и мед) [8, 9]¹¹,

⁸ Международные ключевые сличения национальных эталонов CCQM-K148.b «Polar analyte in solid organic material: Mass fraction of oxytetracycline in solid organic material». <https://www.bipm.org/kcdb/comparison?id=1816>

⁹ Международные ключевые сличения национальных эталонов CCQM-K179 «Polar analyte in solid organic material: Mass fraction of oxytetracycline hydrochloride in solid organic material». <https://www.bipm.org/kcdb/comparison?id=1817>

¹⁰ Справочник лекарственных средств VIDAL. Действующее вещество – Окситетрациклин. <https://www.vidal.ru/drugs/molecule/790>

¹¹ ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (с изменениями на 23 июня 2023 года).

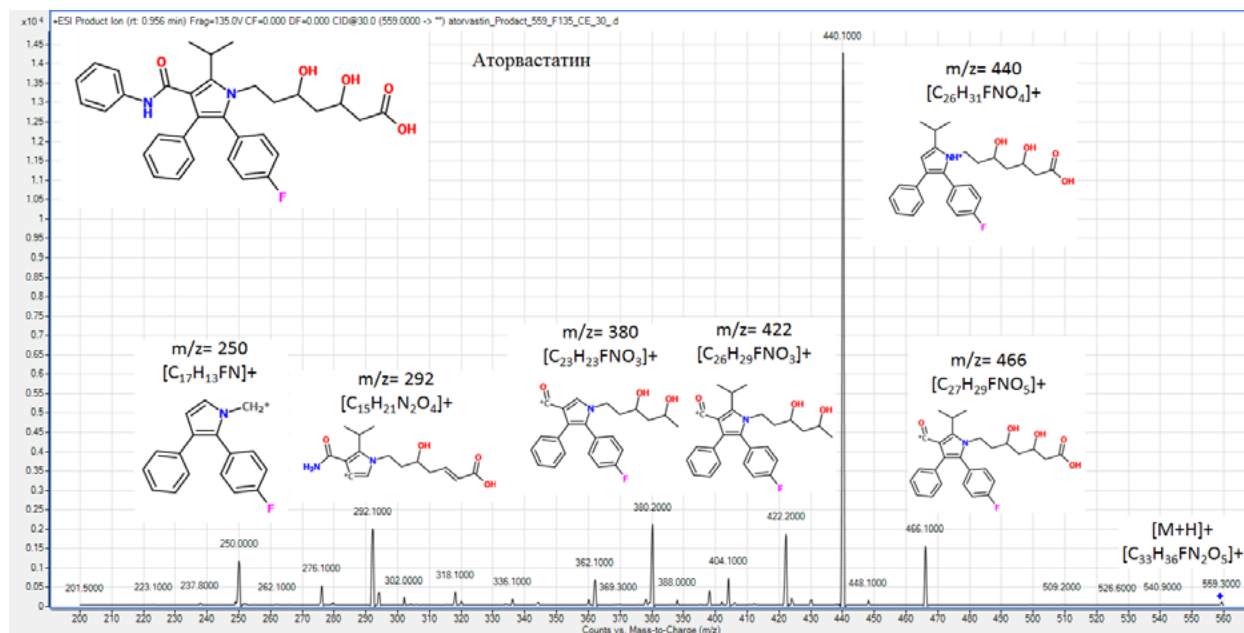


Рис. 3. Фрагментарный масс-спектр в режиме ESI(+) образца аторвастатина кальция тригидрата и предположительная схема фрагментации молекулы

Fig.3. Fragmentary mass spectrum of atorvastatin calcium trihydrate sample in ESI(+) mode and hypothetical diagram of molecule fragmentation

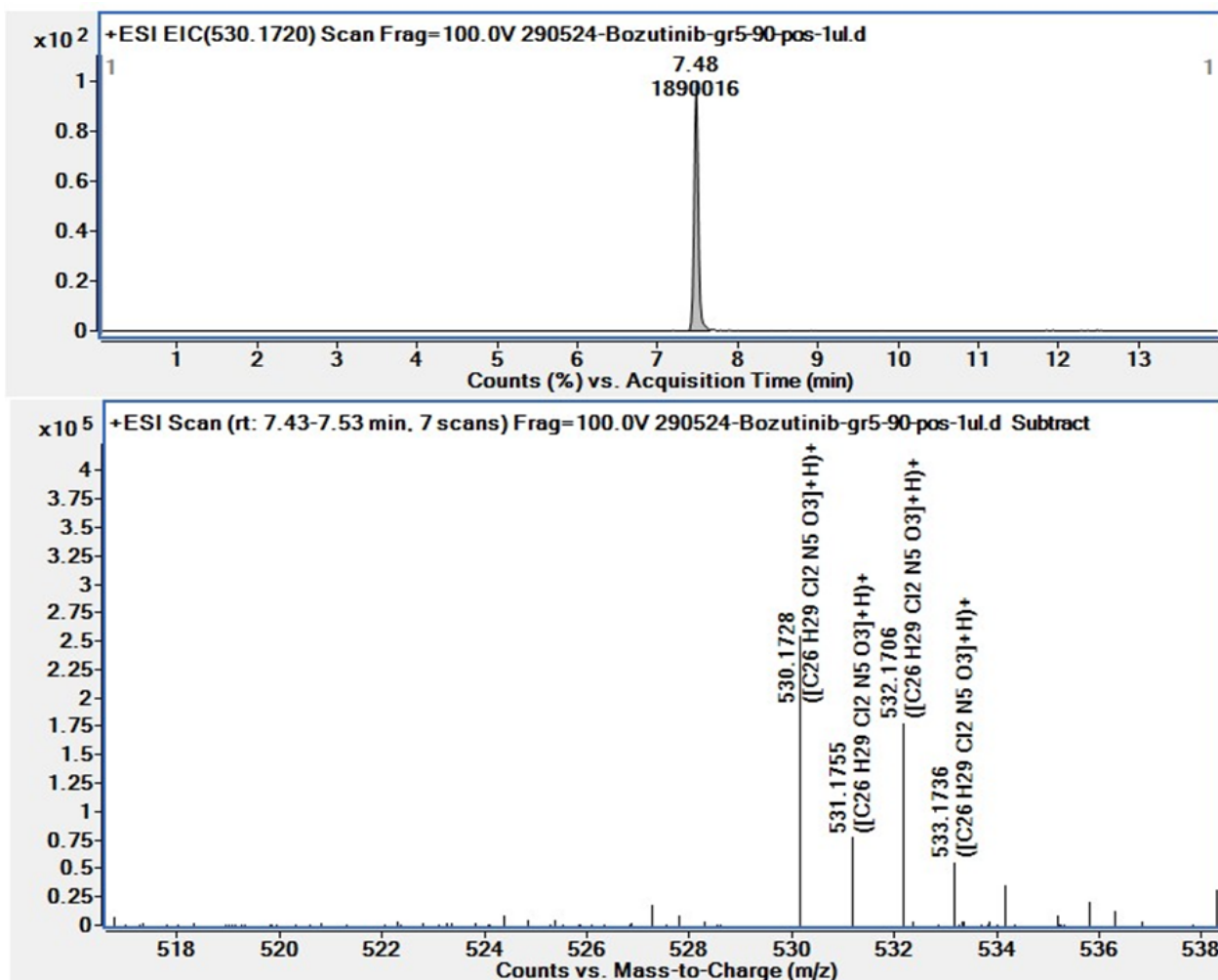


Рис. 4. Масс-хроматограмма по выделенному току и масс-спектр в режиме ESI(+) образца бозутиниба моногидрата

Fig.4. Mass chromatogram and mass spectrum of bosutinib monohydrate sample in ESI(+) mode

что требует соответствующего метрологического обеспечения.

Общепринятый международный подход к определению чистоты органических веществ, основанный на методе МБ, заключается в максимально полном исследовании ЧВ с целью определения всех возможных примесных компонентов, после чего массовую долю ОК рассчитывают по формуле «100 % минус сумма примесей». Метод МБ для органических веществ предполагает измерение четырех групп вероятных примесей: 1) примеси родственных соединений; 2) примеси воды; 3) примеси летучих органических соединений; 4) примеси нелетучих соединений [2].

В соответствии с документом МХ–(Хд 4.092.000–068)–2023 измеряли (результаты табл. 2):

- а) примеси родственных соединений – методом ВЭЖХ-DAD;
- б) примеси летучих органических соединений – методами ГХ–МС и ГХ–ПИД;
- в) примеси воды – методом кулонометрического титрования по Карлу Фишеру;
- г) примеси нелетучих соединений – методом термогравиметрии;
- д) содержание хлорид-ионов – методами ионной хроматографии и капиллярного электрофореза.

На основании полученных результатов измерений была определена массовая доля

Таблица 2. Результаты измерений содержания компонентов в ОТС.НCl
Table 2. Results of impurity content measurements in ОТС.НCl

Измеряемая величина	Значение величины, %	Стандартная неопределенность тип А, %	Стандартная неопределенность тип В, %	Суммарная стандартная неопределенность, %	Расширенная неопределенность (при $k=2$, $P=0,95$), %
Массовая доля примесей РС (суммарно), w_{PC}	1,77	0,002	0,091	0,092	0,19
Массовая доля примесей ЛОС (суммарно), $w_{ЛОС}$	0,56	0,005	0,004	0,006	0,02
Массовая доля примесей НС (суммарно), $w_{НС/оп}$	менее 0,04	-	0,02	0,02	0,04
Массовая доля примеси воды, w_{H_2O}	6,24	0,05	0,11	0,12	0,24
Массовая доля хлорид-ионов, w_{Cl^-}	7,29	0,07	0,21	0,22	0,44

основного компонента (окситетрациклина гидрохлорида) и действующего вещества окситетрациклина (органическая часть молекулы) в ОТС.НCl: чистота ОТС.НCl – $(91,93 \pm 0,30)\%$, массовая доля окситетрациклина в ОТС.НCl – $(84,45 \pm 0,54)\%$.

По результатам исследований были установлены метрологические характеристики новой установки и ГЭТ 208 при работе с чистыми органическими веществами с массовой долей основного компонента в диапазоне от 80 до 100%.

Измерение массовой доли органических компонентов в материале

Среди материалов наиболее сложны в работе твердые комплексные матрицы, в том числе – пищевые продукты. Чтобы определить возможности нового оборудования для измерений содержания органических компонентов в твердом материале, за модель приняли массовую долю метронидазола в лиофилизированном свином мясе¹².

12 Международные ключевые сличения национальных эталонов CCQM-K180 «Polar analyte in high protein food matrix – metronidazole in porcine muscle». <https://www.bipm.org/kcdb/comparison?id=1835>

Метронидазол – антибиотик ряда нитроимидазолов, которые проявляют антигельминтные свойства, а также являются кокцидиостатиками¹³. Из-за доказанной генотоксичности и подозреваемых канцерогенных свойств метронидазол отнесен к запрещенным соединениям и подлежит контролю в пищевых продуктах^{7, 14, 15}, при этом аналитический метод должен обеспечивать измерение

13 Справочник лекарственных средств VIDAL. Действующее вещество – Метронидазол. <https://www.vidal.ru/drugs/molecule/686>

14 Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Commission Regulation (EU) No 37/2010, 2009.

15 Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council. Reg. (EC) 470/2009, 2009.

следов метронидазола на уровне 1 мкг/кг ($1 \cdot 10^{-7} \%$)¹⁶.

Наилучшая на данный момент аналитическая практика предполагает измерение массовой доли органических компонентов в сложных матрицах с использованием метода масс-спектрометрии и техники изотопного разбавления¹⁷ [10–12]. Измерения выполняли по методикам измерений МИ 023-ССQM K180–2023 и МИ 024-ССQM K180–2023 на оборудовании ВЭЖХ–МС/МС (Agilent 6460 Triple Quad) и ВЭЖХ–Q/TOF (Agilent Q-TOF LC/MS6530), в качестве изотопно-меченого аналога аналита использовали метронидазол – $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$ ¹⁸.

Метрологические характеристики МИ приведены в табл. 3, бюджет неопределенности представлен в табл. 4.

Бюджет неопределенности измерений МИ был сформирован на основании

математической модели измерений, характерной для метода изотопного разбавления, в соответствии с уравнением

$$w_{MNZij} = \frac{S_{anij} \cdot m_{BCi}}{S_{BCij} \cdot RF \cdot m_i}, \quad (1)$$

где w_{MNZij} – массовая доля метронидазола при j -ом измерении i -й навески;

S_{anij} и S_{BCij} – площади хроматографических пиков метронидазола и изотопно-меченого внутреннего стандарта при j -ом измерении i -й навески, у. е.; ($j = 1, 2, 3, 5$; $i = 1, 2, 3, 4, 5$);

m_{BCi} – масса внутреннего стандарта, внесенного в i -ю навеску, нг;

m_i – масса i -й навески в пересчете на сухое вещество, г;

RF – градуировочный фактор отклика метронидазола относительно изотопно-меченого внутреннего стандарта.

Обе МИ предполагают выполнение пяти независимых измерений в условиях повторяемости по точечной градуировочной характеристике.

Для выполнения измерений по МИ на ГЭТ 208 была воспроизведена единица величины «массовая доля ОК в чистом веществе метронидазоле». Охарактеризованное чистое вещество метронидазол использовали в качестве калибранта для градуировки аналитического оборудования, что обеспечило прослеживаемость результата измерений к ГЭТ 208 и Международной системе единиц. Массовая

¹⁶ EURL, EURL Guidance on minimum method performance requirements (MMPRs) for specific pharmacologically active substances in specific animal matrices, 2022. <https://eurl-residues.eu/>; <https://eurlresidues.eu/eurl-portal/portal-guidance-documents/>

¹⁷ ГОСТ 34533–2019 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

¹⁸ Метронидазол – $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}_2$ с массовой долей основного компонента 99,3 %. Производитель Supelco, кат. № 32744. <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/sial/32744>

Таблица 3. Метрологические характеристики МИ 023-ССQM K180–2023 / МИ 024-ССQM K180–2023

Table 3. Metrological characteristics of MI 023-CCQM K180–2023 / MI 024-CCQM K180–2023

Измеряемая величина	Диапазон измерений, г/г	Относительная стандартная неопределенность, тип А %	Относительная стандартная неопределенность, тип В %	Относительная суммарная стандартная неопределенность, %	Относительная расширенная неопределенность (при $k=2$, $P=0,95$), %
Массовая доля метронидазола в лиофилизированных мясных продуктах	от $1,0 \cdot 10^{-10}$ до $1,0 \cdot 10^{-6}$	3,34 / 2,04	2,99 / 2,40	4,49 / 3,15	9,0 / 6,4

Соответствует доверительным границам относительной погрешности (при $P=0,95$), %.

Таблица 4. Бюджет неопределенности измерений массовой доли метронидазола в лиофилизированных мясных продуктах в соответствии с МИ 023-ССQM K180–2023 / МИ 024-ССQM K180–2023

Table 4. Uncertainty budget for measurements of metronidazole mass fraction in lyophilized meat products in accordance with MI 023-CCQM K180–2023 / MI 024-CCQM K180–2023

Источник неопределенности	Тип оценки	Относительная стандартная неопределенность, %
Масса пробы, u_m	B	0,0038
Массовая доля ОК в калибрante, $u_{ПЭЧВ}$	B	0,01
Приготовление исходных растворов, $u_{раств}$	B	0,58
Приготовление градуировочных растворов, $u_{гр}$	B	0,065
Определение градуировочного фактора отклика, u_{RF}	A	0,70
Масса вносимого в пробу внутреннего стандарта, u_{BC}	B	0,31
Измерение массовой доли аналита в пробе, $u_{изм}$	A	3,34 / 2,04
Определение массовой доли влаги, u_{H_2O}	B	0,62
Влияние холостого опыта, $u_{бланк}$	B	2,76 / 2,2
Относительная суммарная стандартная неопределенность, u_c		4,49 / 3,15
Относительная расширенная неопределенность(при $k=2$, $P=0,95$), U		8,98 / 6,30
Принято		9,0 / 6,4

доля метронидазола в материале составила $(9,50 \pm 0,40)$ мкг/кг.

Проведенные исследования позволили установить метрологические характеристики новой установки при работе с органическими веществами в твердых пищевых продуктах и расширить возможности усовершенствованного эталона в части воспроизведения единиц массовой доли компонентов в растворах и материалах.

Заключение

- По результатам проведенных исследований:
- а) расширены функциональные возможности ГПЭ – в область применения ГЭТ 208 включены органические компоненты с молярной массой до 3 500 а. е. м.;
 - б) расширены диапазоны воспроизведения единиц массовой доли основных компонентов в чистых веществах (более чем на 16%), единиц массовой доли компонентов в растворах (более

чем на порядок) и массовой доли компонентов в материалах (более чем на четыре порядка).

Все полученные в процессе исследований экспериментальные данные были обобщены и документированы в Паспорте эталона (табл. 5). Приказ Росстандарта № 264 об утверждении ГПЭ ГЭТ 208-2024 подписан 1 февраля 2024 года¹⁹.

На настоящий момент на усовершенствованном эталоне продолжают исследования и испытания в целях утверждения типа СО состава фармацевтических субстанций, что наглядно демонстрирует востребованность ГЭТ 208

¹⁹ Приказ Росстандарта № 264 от 01.02.2024 «Об утверждении Государственного первичного эталона единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации органических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии с изотопным разбавлением и гравиметрии».

Таблица 5. Метрологические характеристики ГЭТ 208 до и после совершенствования
Table 5. Metrological characteristics of GET 208 before and after improvement

Матрица	ГЭТ 208-2019		ГЭТ 208-2024	
	Диапазон значений	Относительная расширенная неопределенность (при $k=2$), %	Диапазон значений	Относительная расширенная неопределенность (при $k=2$), %
Чистые вещества	массовая доля ОК от 0,94 до 0,99 г/г (от 94,00 до 99,99 %)	от 3,0 до 0,01	массовая доля ОК от 0,80 до 1,00 г/г (от 80,00 до 100,00 %)	от 3,0 до 0,01
	молярная доля ОК от 94,00 до 99,99 %	от 3,0 до 0,01	молярная доля ОК от 80,00 до 100,00 %	от 3,0 до 0,01
Растворы чистых веществ	массовая доля компонентов от $1,0 \cdot 10^{-8}$ до 0,5 г/г (от $1,0 \cdot 10^{-6}$ до 50 %)	от 3,0 до 0,01	массовая доля компонентов от $0,5 \cdot 10^{-9}$ до 0,5 г/г (от $0,5 \cdot 10^{-7}$ до 50 %)	от 5,0 до 0,01
	массовая концентрация компонентов от $1,0 \cdot 10^{-5}$ до 100 г/дм ³	от 3,0 до 1,0	массовая концентрация компонентов от $1,0 \cdot 10^{-5}$ до 100 г/дм ³	от 3,0 до 1,0
	молярная концентрация компонентов от $0,2 \cdot 10^{-3}$ до 2,0 моль/дм ³	от 3,0 до 1,0	молярная концентрация компонентов от $0,3 \cdot 10^{-8}$ до 2,5 моль/дм³	от 3,0 до 1,0
Материалы	массовая доля компонентов от $1,0 \cdot 10^{-8}$ до 0,99 г/г (от $1,0 \cdot 10^{-6}$ до 99 %)	от 3 до 0,01	массовая доля компонентов от $0,4 \cdot 10^{-12}$ до 0,99 г/г (от $0,4 \cdot 10^{-10}$ до 99 %)	от 12 до 0,01
	массовая концентрация компонентов от $1,0 \cdot 10^{-5}$ до 100 г/дм ³	от 3,0 до 1,0	массовая концентрация компонентов от $1,0 \cdot 10^{-5}$ до 100 г/дм ³	от 3,0 до 1,0
	молярная концентрация компонентов от $0,2 \cdot 10^{-3}$ до 2,0 моль/дм ³	от 3,0 до 1,0	молярная концентрация компонентов от $0,3 \cdot 10^{-8}$ до 2,5 моль/дм³	от 3,0 до 1,0

В таблице полужирным шрифтом выделены измененные метрологические характеристики ГЭТ 208.

и готовность российского ГПЭ отвечать на новые вызовы, в частности – в интересах фарминдустрии в условиях наращивания производства отечественных лекарственных препаратов.

Усовершенствованный ГЭТ 208 был и остается основным звеном в реализации идеологии эквивалентности измерений на международном уровне²⁰ и единства измерений в Российской

²⁰ THE CIPM MRA: 2005 INTERPRETATION DOCUMENT, Revised in October 2016. https://www.bipm.org/utls/common/documents/CIPM-MRA/CIPM-MRA-Interpretation-document_update2016.pdf

Федерации²¹ в области органического анализа. Новое современное оборудование, включенное в состав ГПЭ, позволит создать научный, методический и приборный задел для воспроизведения единиц величин широкой номенклатуры органических соединений и обеспечить метрологический сервис в интересах всех областей народного хозяйства. Успешное участие ГЭТ 208 в международных сличениях

²¹ Федеральный закон № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

гарантирует признание результатов измерений в области органического анализа на международном уровне.

Благодарности: Авторы выражают благодарность сотрудникам научно-исследовательского отдела государственных эталонов в области органического и неорганического анализа ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева», принимавшим участие в исследованиях.

Acknowledgments: The authors express their gratitude to the workers of the Research Department of State Standards in the Field of Organic and Inorganic Analysis of the D. I. Mendeleev Institute for Metrology (VNIIM) who took part in the research.

Вклад соавторов: Михеева А. Ю. – методология, валидация, визуализация, создание рукописи и ее редактирование; Лопушанская Е. М. – проведение исследования, формальный анализ, визуализация; Крылов А. И. – руководство исследованием, администрирование проекта.

Contribution of the authors: Mikheeva A. Yu. – methodology, validation, visualization, writing – original draft; Lopushanskaya E. M. – investigation, formal analysis, visualization; Krylov A. I. – supervision, project administration.

Конфликт интересов: А. И. Крылов является членом редколлегии журнала «Эталоны. Стандартные образцы». Остальные авторы

заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest: Anatoliy I. Krylov is a member of the editorial board of the journal «Measurement Standards. Reference Materials». The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in the article.

Финансирование: Материал статьи подготовлен в рамках государственного задания к Соглашению № 172-11-2023-002 от 09.02.2023 о предоставлении субсидий на безвозмездной и безвозвратной основе на возмещение затрат, связанных с осуществлением мероприятий в области обеспечения единства измерений «Разработка и совершенствование государственных первичных эталонов единиц величин, а также разработка и совершенствование государственных первичных референтных методов (методов) измерений».

Funding: The study reported in this publication was carried out as part of state assignment to Agreement No. 172-11-2023-002 dated 09.02.2023 on the provision of subsidies on a gratuitous and non-repayable basis to reimburse costs associated with the implementation of measures in the field of ensuring the uniformity of measurements «Development and improvement of state primary standards of units of measurement, as well as the development and improvement of state primary reference methods (methods) of measurements».

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kaarls R., Quinn T. J. The Comite Consultatif pour la Quantite de Matiere: a brief review of its origin and present activities // *Metrologia*. Vol. 34, № 1. P. 1–5. <http://iopscience.iop.org/0026-1394/34/1/1>
2. Methods for the SI-traceable value assignment of the purity of organic compounds (IUPAC Technical Report) / S. Westwood [et al.] // *Pure and Applied Chemistry*. 2023. Vol. 95, № 1. P. 1–77. <https://doi.org/10.1515/pac-2020-0804>
3. Mass balance method for the SI value assignment of the purity of organic compounds / S. Westwood [et al.] // *Analytical Chemistry*. 2013. Vol. 85, Iss. 6. P. 3118–3126. <https://doi.org/10.1021/ac303329k>
4. The role of the CCQM OAWG in providing SI traceable calibrators for organic chemical measurements / K. A. Lippa [et al.] // *Accreditation and Quality Assurance*. 2019. Vol. 24. P. 407–415. <https://doi.org/10.1007/s00769-019-01407-6>
5. Михеева А. Ю., Крылов А. И. Прослеживаемость в органическом анализе. Ч. 1: Эквивалентность национальных и международных эталонов // *Эталоны. Стандартные образцы*. 2020. Т. 16, № 3. С. 5–21. <https://doi.org/10.20915/2687-0886-2020-16-3-5-21>
6. Международная система единиц (SI) / Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. 9-е изд. М.: Росстандарт, 2019. 100 с.
7. Мильман Б. Л., Журкович И. К. Обобщенные критерии идентификации химических соединений методами хроматографии – масс-спектрометрии // *Аналитика и контроль*. 2020. Т. 24, № 3. С. 164–173. <https://elar.urfu.ru/handle/10995/97975>

8. Granados-Chinchilla F., Rodriguez C. Tetracyclines in food and feedingstuffs: from regulation to analytical methods, bacterial resistance, and environmental and health implications // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2017. Vol. 2017. P. 1–24. <https://doi.org/10.1155/2017/1315497>
9. Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC–MS–MS / A. K. Lykkeberg [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004. Vol. 34, Iss. 2. P. 325–332. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00500-4](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00500-4)
10. Determination and confirmation of metronidazole, dimetridazole, ronidazole and their metabolites in bovine muscle by LC–MS/MS / R. H. M. M. Granja [et al.] // *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2013. Vol. 30, № 6. P. 970–976. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2013.787653>
11. A new LC–MS/MS method for multiple residues/contaminants in bovine meat / Z. Hajrulai-Musliu [et al.] // *BMC Chemistry*. 2021. Vol. 15, № 1. P. 62. <https://doi.org/10.1186/s13065-021-00788-5>
12. Development of a multi-class method to determine nitroimidazoles, nitrofurans, pharmacologically active dyes and chloramphenicol in aquaculture products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / D. Chen [et al.] // *Food Chemistry*. 2020. Vol. 311. P. 125924. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125924>

REFERENCE

1. Kaarls R., Quinn T. J. The Comite Consultatif pour la Quantite de Matiere: a brief review of its origin and present activities. *Metrologia*. 1997;34(1):1–5. <http://iopscience.iop.org/0026-1394/34/1/1>
2. Westwood S., Lippa K., Shimuzu Y., Lalerle B., Saito T., Duewer D. et al. Methods for the SI-traceable value assignment of the purity of organic compounds (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2023;95(1):1–77. <https://doi.org/10.1515/pac-2020-0804>
3. Westwood S., Choteau T., Daireaux A., Josephs R. D., Wielgosz R. I. Mass balance method for the SI value assignment of the purity of organic compounds. *Analytical Chemistry*. 2013;85(6):3118–3126. <https://doi.org/10.1021/ac303329k>
4. Lippa K. A., Duewer D. L., Nelson M. A., Davies S. R., Mackay L. G. The role of the CCQM OAWG in providing SI traceable calibrators for organic chemical measurements. *Accreditation and Quality Assurance*. 2019;24:407–415. <https://doi.org/10.1007/s00769-019-01407-6>
5. Mikheeva A. Yu., Krylov A. I. Traceability in organic analysis. Report 1: Equivalence of the national and international measurement standards. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2020;16(3):5–21. (In Russ.). <https://doi.org/10.20915/2687-0886-2020-16-3-5-21>
6. International System of Units (SI): Federal Agency for Technical Regulation and Metrology. 9th ed. Moscow: Rosstandart; 2019. 100 p. (In Russ.).
7. Milman B. L., Zhurkovich I. K. Summarized criteria of chemical compounds identification by chromatography-mass spectrometry. *Analytics and control*. 2020;24(3):164–173. (In Russ.). <https://elar.urfu.ru/handle/10995/97975>
8. Granados-Chinchilla F., Rodriguez C. Tetracyclines in food and feedingstuffs: from regulation to analytical methods, bacterial resistance, and environmental and health implications. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2017;2017:1–24. <https://doi.org/10.1155/2017/1315497>
9. Lykkeberg A. K., Halling-Sorensen B., Cornett C., Tjornelund J., Honore Hansen S. Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC–MS–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004;34(2):325–332. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00500-4](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00500-4)
10. Granja R. H. M. M., Nino A. M. M., Reche K. V. G., Giannotti F. M., de Lima A. C., Wanschel A. C. B. A. et al. Determination and confirmation of metronidazole, dimetridazole, ronidazole and their metabolites in bovine muscle by LC–MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2013;30(6):970–976. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2013.787653>
11. Hajrulai-Musliu Z., Uzunov R., Jovanov S., Jankuloski D., Stojkovski V., Pendovski L. et al. A new LC–MS/MS method for multiple residues/contaminants in bovine meat. *BMC Chemistry*. 2021;15(1):62. <https://doi.org/10.1186/s13065-021-00788-5>
12. Chen D., Delmas J. M., Hurtaud-Pessel D., Verdon E. Development of a multi-class method to determine nitroimidazoles, nitrofurans, pharmacologically active dyes and chloramphenicol in aquaculture products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2020;311:125924. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125924>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Михеева Алена Юрьевна – канд. хим. наук, заместитель руководителя отдела госэталонов в области органического и неорганического анализа ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»

190005, Россия, г. Санкт-Петербург, Московский пр., 19

e-mail: may@b10.vniim.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1032-5653>

Лопушанская Елена Михайловна – ведущий инженер отдела госэталонов в области органического и неорганического анализа ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»

190005, Россия, г. Санкт-Петербург, Московский пр., 19

e-mail: e.m.lopushanskaya@vniim.ru

Крылов Анатолий Иванович – д-р хим. наук, руководитель отдела госэталонов в области органического и неорганического анализа ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»

190005, Россия, г. Санкт-Петербург, Московский пр., 19

e-mail: akrylov@b10.vniim.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Alena Yu. Mikheeva – Cand. Sci. (Chem.), Deputy Head of the Department of State Measurement Standards in the field of Organic And Inorganic Analysis, D. I. Mendeleyev Institute for Metrology

19 Moskovskiy ave., St. Petersburg

190005, Russia

e-mail: may@b10.vniim.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1032-5653>

Elena M. Lopushanskaya – Leading Engineer of the Department of State Measurement Standards in the field of Organic and Inorganic Analysis, D. I. Mendeleyev Institute for Metrology

19 Moskovskiy ave., St. Petersburg

190005, Russia

e-mail: e.m.lopushanskaya@vniim.ru

Anatoliy I. Krylov – Dr. Sci. (Chem.), Department Head of the Department of State Measurement Standards in the field of Organic and Inorganic Analysis, D. I. Mendeleyev Institute for Metrology

19 Moskovskiy ave., St. Petersburg

190005, Russia

e-mail: akrylov@b10.vniim.ru