

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Кривошеков Сергей Владимирович

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В КРОВИ МЕТОДОМ
ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Юсубов М.С. оглы

Томск 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Свойства гексафторида серы, его применение в промышленности, науке и медицине.....	11
1.2 Методы количественного определения гексафторида серы в различных объектах.....	18
1.2.1. Газохроматографическое определение гексафторида серы.....	18
1.2.2. Иные методы определения гексафторида серы.....	29
1.3. Методы пробоподготовки крови при определении газов.....	30
1.4. Методы количественного анализа в газовой хроматографии.....	33
Выводы по главе 1.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, АППАРАТУРА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..	39
2.1 Описание реактивов, стандартных образцов и материалов.....	39
2.2. Приготовление растворов.....	41
2.2.1. Выбор экстрагента и приготовление раствора гексафторида серы.....	41
2.2.2. Изучение стабильности насыщенного раствора гексафторида серы	43
2.2.3. Приготовление растворов внутреннего стандарта и калибровочных образцов.....	44
2.4 Оборудование.....	46
2.5. Методы изучения фармакокинетики.....	47
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В КРОВИ МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.....	49
3.1. Хроматографическое поведение гексафторида серы и его детектирование.....	49

3.1.1. Подбор условий хроматографической системы для определения гексафторида серы.....	49
3.1.2. Влияние температуры источника ионов масс-детектора на аналитический сигнал гексафторида серы.....	52
3.2. Выбор внутреннего стандарта.....	55
3.3. Подбор рабочих условий экстракции гексафторида серы из образцов крови.....	58
3.4. Стабильность биологических и градуировочных образцов гексафторида серы.....	62
3.4.1. Стабильность градуировочных растворов гексафторида серы...	62
3.4.2. Кратковременная стабильность образцов крови.....	62
3.4.3. Долговременная стабильность образцов крови.....	64
3.5. Разработка алгоритма газохроматографической методики определения гексафторида серы в крови.....	65
3.5.1. Оценка мешающего влияния органической матрицы.....	65
3.5.2. Алгоритм пробоподготовки образцов крови.....	66
3.6. Проверка правильности методики определения гексафторида серы.....	70
Выводы по главе 3.....	71
ГЛАВА 4. ОЦЕНКА МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В КРОВИ МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.....	72
4.1. Оценка предела обнаружения и предела количественного определения..	73
4.2. Градуировочная зависимость гексафторида серы.....	75
4.3. Оценка повторяемости методики количественного определения гексафторида серы в крови.....	80
4.4. Оценка внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения гексафторида серы в крови.....	83

4.5. Оценка правильности методики количественного определения гексафторида серы в крови.....	85
4.6. Оценка показателя точности методики количественного определения гексафторида серы в крови.....	87
Выводы по главе 4.....	90
ГЛАВА 5. АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В КРОВИ МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.....	91
Выводы по главе 5.....	98
ВЫВОДЫ.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103
Приложение А.....	115
Приложение Б.....	116

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Внедрение новых лекарственных средств в современных условиях надлежащих практик (GMP, GLP) сталкивается с проблемой разработки чувствительных и селективных методов определения действующих веществ на этапе доклинических исследований с целью стандартизации лекарственных препаратов, а так же при изучении их фармакологических свойств (в частности – фармакокинетики).

Гексафторид серы (ГС) – высший фторид серы(VI), применяемый во многих областях народного хозяйства. Так, например, он используется в высокоэнергетической электронике в качестве сигнализатора утечек; за счет уникальных свойств (скорость звука в среде ГС составляет 6 м/с) его используют в качестве действующего вещества эхоконтрастных лекарственных средств для ультразвуковой диагностики. На сегодняшний день известен ряд препаратов на основе ГС, например Sonovue (Bracco, Италия). Группой ученых ТПУ и СибГМУ разработан первый отечественный препарат на основе ГС для ультразвуковой визуализации очаговых воспалительных процессов. Прежде, чем испытания начнутся на людях, новый препарат обязан пройти все стадии доклинических исследований (ДКИ) с использованием животных. Результаты доклинических испытаний, включая исследование фармакокинетики, используют в планировании клинических испытаний и для принятия важных решений, подтверждающих эффективность лекарственного средства.

На этапе ДКИ, должна быть оценена фармакокинетика лекарственного средства (ЛС) на опытных животных. Изучение фармакокинетических параметров основывается на измерении содержания действующего вещества в организме экспериментальных животных в зависимости от времени, и чем точнее и правильнее будет проводиться это измерение, тем качественней можно будет перенести исследование препарата на человека. Таким образом, первоочередная задача фармакокинетических исследований нового препарата на основе ГС

сводится к разработке методов количественного определения действующего вещества – гексафторида серы.

Из литературы известны два метода количественного определения ГС. Первый – это инфракрасная спектроскопия (ИКС). Использование ИКС находит широкое применение в экологическом контроле воздуха на предмет определения содержания газообразных загрязнителей, в том числе и ГС. Однако данный метод не лишен недостатков, сложная пробоподготовка и интерпретация результатов затрудняют определение ГС в сложных матрицах.

Второй метод – это газовая хроматография на набивных и капиллярных колонках с использованием, в основном, электроно-захватного и масс-спектрометрического детекторов. Применение ГХ для определения ГС также сводится к экологическому контролю гидро-, лито- и атмосферы. Многообразие описываемых в литературе газохроматографических методов определения ГС в различных экологических объектах объясняется его высокой активностью по отношению к деструкции озонового слоя, и как следствие, сильному влиянию на глобальное потепление. Однако подход к потоковому анализу объектов с биологической матрицей (например, клинический анализ) кардинально отличается из-за возможного влияния компонентов пробы на аналитический сигнал. Так, использование набивных колонок, при всех достоинствах имеет существенное ограничение – длительность анализа, поэтому предпочтение отдают капиллярным колонкам для экспрессности рутинных анализов. В то же время, учитывая сложность матрицы объекта анализа (кровь), селективность можно повысить использованием более избирательного детектора - масс-спектрометрического.

Методы определения ГС с помощью хромато-масс-спектрометрии известны давно, но наличие самой современной аппаратуры не гарантирует успеха без научно-обоснованного выбора условий процедуры пробоподготовки в связи с многокомпонентностью биологической матрицы.

Несмотря на многообразие описанных в литературе хроматографических методов, в доступных источниках нам не удалось найти описание экспрессного,

не трудоемкого и не требующего специального оборудования метода определения ГС в биологических средах (кровь) методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

Таким образом, актуальной задачей является разработка высокочувствительной и селективной методики определения гексафторида серы методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в образцах со сложной биологической матрицей (кровь).

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось изучение поведения гексафторида серы в условиях ГХ-МС анализа с использованием капиллярных колонок и разработка хромато-масс-спектрометрической методики количественного определения ГС в цельной крови.

Для достижения поставленной цели, были поставлены следующие задачи:

1. Изучить хроматографическое поведение ГС с использованием капиллярных колонок и подобрать рабочие условия элюирования.
2. Оценить влияние основных факторов на аналитический сигнал ГС при его масс-спектрометрическом детектировании.
3. Изучить параметры экстракции ГС из цельной крови и разработать алгоритм пробоподготовки для его последующего хроматографического определения .
4. Разработать методику количественного химического анализа цельной крови для определения ГС методом ГХ-МС и рассчитать основные ее метрологические характеристики.
5. Провести апробацию методики количественного определения ГС методом хромато-масс-спектрометрии в эксперименте на животных.

Научная новизна.

Впервые установлены закономерности влияния режима сканирования и температуры источника ионов масс-спектрометрического детектора на аналитический сигнал гексафторида серы.

Впервые изучена возможность применения гептана для жидкость-жидкостной экстракции ГС из образцов цельной крови и определены основные параметры: время экстракции и соотношение «проба : экстрагент».

Разработан алгоритм пробоподготовки образцов цельной крови с использованием жидкость-жидкостной экстракции ГС гептаном для газохроматографического определения ГС.

Предложена газохроматографическая методика определения ГС в крови и впервые определены ее метрологические характеристики.

Впервые с использованием разработанной газохроматографической методики определены фармакокинетические параметры нового УЗИ-контрастного препарата.

Практическая значимость.

Разработанная хроматографическая методика количественного определения гексафторида серы в крови нивелирует матричный эффект, экспрессна и не требует специального оборудования для пробоподготовки. Методика расширяет арсенал методов изучения фармакокинетики лекарственных средств на основе ГС. Определены метрологические характеристики, которые соответствуют предъявляемым к биоаналитическим методикам требованиям. Проведена метрологическая экспертиза методики количественного определения гексафторида серы ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России и рекомендована к аттестации.

Методика внедрена в практику работы НИИ ФиРМ им. Гольдберга и Центра внедрения технологий СибГМУ для изучения фармакокинетических параметров лекарственных средств на основе ГС.

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты изучения хроматографического поведения и влияния параметров масс-детектора на аналитический сигнал гексафторида серы.
2. Рабочие условия ГХ-МС системы для количественного определения ГС.
3. Алгоритм методики анализа образцов крови с применением жидкость-жидкостной экстракции на этапе пробоподготовки.
4. Методика определения гексафторида серы в образцах крови методом ГХ-МС и результаты ее метрологической оценки.
5. Результаты анализа образцов крови экспериментальных животных при определении фармакокинетики нового контрастного препарата.

Апробация результатов исследования. Основные результаты исследования легли в основу 7 работ, в том числе 4 статьи в журналах из перечня ВАК (из них 2 статьи переведены на английский язык), 1 патент Российской Федерации и 2 доклада и тезиса докладов на международных и всероссийских конференциях. Проведена метрологическая экспертиза методики количественного определения гексафторида серы ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России и рекомендована к аттестации (Приложение А).

Личный вклад автора состоит из планирования экспериментальной работы, получении хроматографических данных, их обработке и систематизации, а также в обобщении и обсуждении результатов работы.

Благодарности.

Автор выражает глубокую признательность руководителю, д.х.н., профессору, М.С. Юсубову и д.фарм.н., профессору М.В. Белоусову за организацию исследования и ценные советы при подготовке диссертационной работы; а также д.х.н., профессору, Г.Б. Слепченко и к.х.н., доценту Л.А. Дрыгуновой за помощь при написании диссертации и неподдельный интерес к работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта ФЦП «Фарма-2020» Государственный контракт от «17» марта 2014 г. № 14.N08.12.0027.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 118 страницах машинописного текста, содержит 37 таблиц и 29 рисунков; состоит из введения, пяти глав, заключения и выводов, списка использованных литературных источников, включающего 109 наименований, 2 приложений.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ИСТОЧНИКОВ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Свойства гексафторида серы, его применение в промышленности, науке и медицине

Впервые гексафторид серы (ГС) был получен в 1900 Ф.Муассаном и П.Лебо при сжигании серы в атмосфере фтора, в результате чего образуется преимущественно ГС. [98].

Гексафторид серы (SF_6 , молекулярный вес 146,07) представляет собой бесцветный, негорючий тяжелый газ без запаха и вкуса с превосходными диэлектрическими характеристиками, которые делают возможность применять его в специальных устройствах электроники, индустриальных процессах, научных областях и продуктах коммерции (например, огнетушители). Благодаря своей низкой токсичности, термической устойчивости и стойкости на пробой, гексафторид серы нашел широкое применение в электронных (в качестве газообразного диэлектрика) и акустических системах с середины 70 годов XX века. Также он используется в качестве ловушки электронов, травильного, заполняющего газа, в качестве путевого газа, хладагента и др. [53,74,83]

Простота структуры (рисунок 1), объясняет его спектральные характеристики.

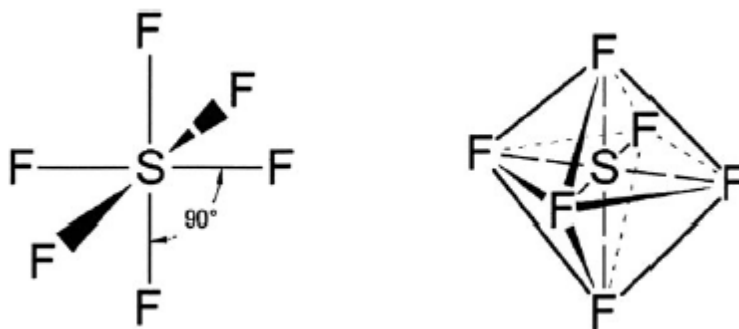


Рисунок 1 – Структура молекулы гексафторида серы (слева) и кристаллографическая структура (справа)

Так, ИК-спектр гексафторида серы содержит сильные полосы поглощения при 615 и 940 см^{-1} , которые соответствуют F_{1u} фундаментальные ν_4 и ν_3 , соответственно (рисунок 2, 3) [76, 89]. Рамановский спектр ГС (рисунок 4) содержит три полосы при 522, 639,5, 769,4 см^{-1} соответствующие колебаниям a_{1g} , e_g и f_{2g} , соответственно.

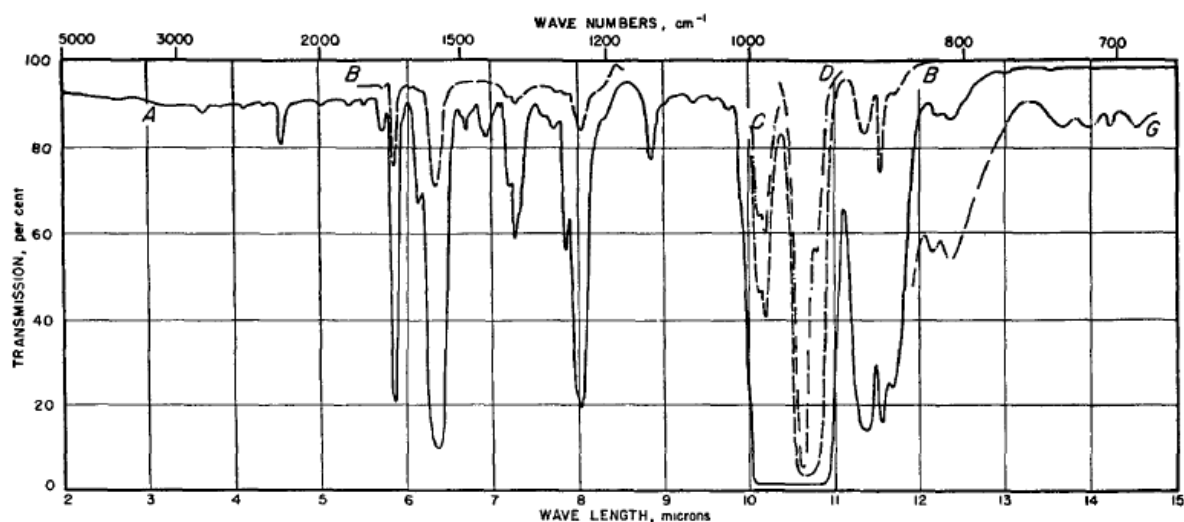


Рисунок 2 – ИК-спектр гексафторида серы (газовая фаза) 700 – 2000 см^{-1}

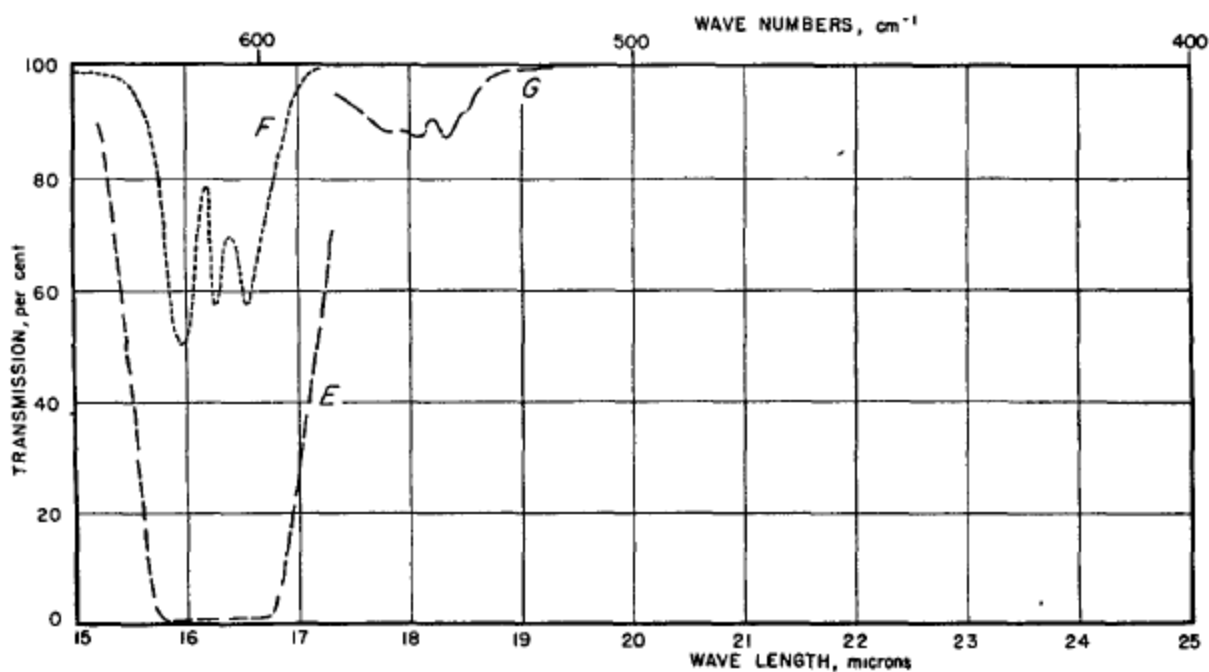


Рисунок 3 – ИК-спектр гексафторида серы (газовая фаза) 500 – 600 см^{-1}

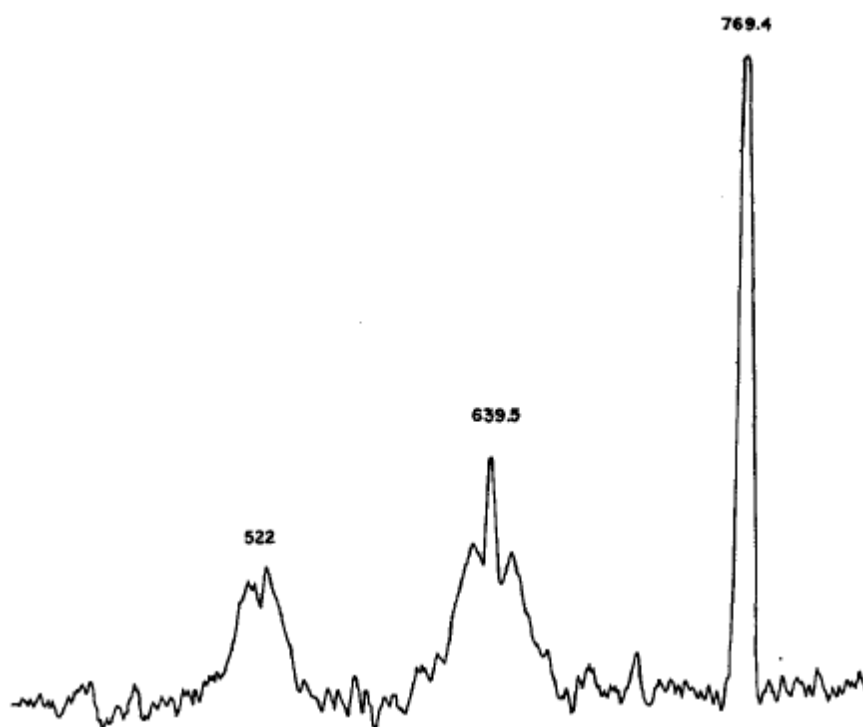


Рисунок 4 – Рамановский спектр гексафторида серы (газовая фаза) [62]

Спектральная активность в этих областях позволяет проводить количественное определение ГС в воздушной среде с использованием простого оборудования и отсутствием пробоподготовки. Однако, из простоты метода следует его ограничение, заключающееся в ограниченном круге объектов для анализа – воздух.

Молекула SF_6 обладает радиально-симметричным строением, в центре ее располагается атом серы, связанный с 6 атомами фтора, что обуславливает появление в масс-спектре сигналов фрагментов, отличающихся количеством атомов фтора, интенсивность которых отображает величину эффективного сечения процесса диссоциативной ионизации электронным ударом. Наиболее стабильный сигнал в масс-спектре (рисунок 5) имеет ион SF_5^+ , причем сигнал молекулярного иона SF_6^+ не всегда может быть обнаружен, что связано, по-видимому, с его нестабильностью (порог ионизации 15,32 эВ) и в течение нескольких пикосекунд диссоциирует с образованием ионов и нейтральных фрагментов [12].

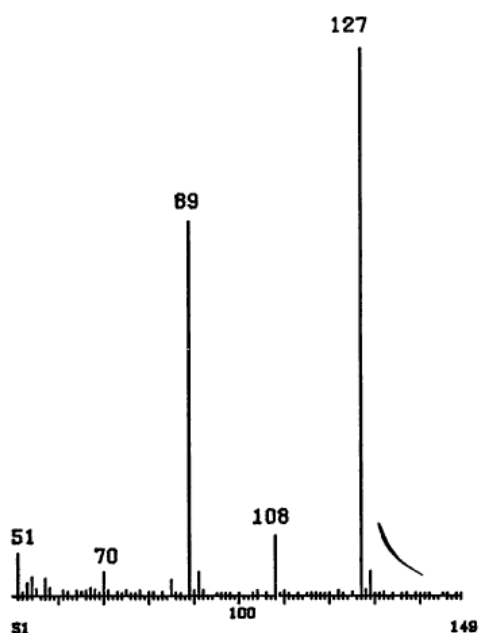


Рисунок 5 – Масс-спектр ГС (регистрация положительных ионов) [71]

Основной пик 127 m/z ($M^+ - 19$) масс-спектра многими авторами [71] предлагается как специфический ион для режима селективного ионного мониторинга для достижения максимальной чувствительности.

Гексафторид серы малорастворим в воде, но довольно хорошо растворяется в неполярных органических растворителях (таблица 1).

Таблица 1 - Растворимость ГС [35,39,52,55,69]

Растворитель	Растворимость, моль SF ₆ × 10 ⁴ (при температуре, °C)			
CCl ₂ F-CClF ₂	423,5 (2,49)	313,3 (14,17)	270,7 (26,44)	247,1 (32,72)
n-C ₇ H ₁₆	127,3 (6,31)	111,9 (16,00)	100,7 (25,08)	93,22 (33,16)
C ₅ H ₁₁ CH ₃	84,15 (7,91)	77,49 (14,77)	70,44 (26,89)	63,94 (34,32)
CCl ₄	80,64 (4,64)	71,47 (14,72)	65,79 (274,71)	61,44 (31,66)
c-C ₆ H ₁₂	62,88 (7,14)	57,14 (17,79)	53,89 (26,78)	50,55 (33,62)
C ₆ H ₅ CH ₃	38,10 (7,91)	36,71 (14,49)	34,03 (24,90)	31,93 (34,42)
C ₆ H ₆	28,60 (7,67)	27,46 (16,12)	26,41 (24,88)	25,53 (35,51)
SiCl ₄	142,8 (25,0)	-	-	-
H ₂ O*	0.0147 (0.1)	0.0076 (14.9)	0.0055 (24.85) 0.005440(25)***	0.00429

Растворитель	Растворимость, моль $\text{SF}_6 \times 10^4$ (при температуре, °C)			
CH_3NO_2^*	0.372 (0.1)	0.363 (19.35)	0.377 (24.85)	-
$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{C}_2\text{F}_5^{**}$	-	-	94.0 (25)	-
$i\text{-C}_8\text{H}_{18}^{**}$	-	-	104.2 (25)	-
CS_2^{**}	-	-	126 (25)	-
CH_3OH	-	-	0.54 (294)*	-
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	-	-	0.70 (294)*	-

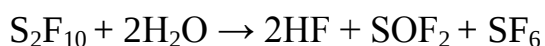
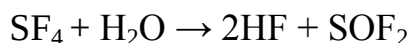
*коэффициент растворимости Оствальда

**парциальный мольный объем

*** коэффициент Бунзена (α) [90]

Из представленных данных, видно, что наиболее подходящими растворителями для ГС являются сероуглерод и 1,1,2-трифтор-1,2,2-трихлорэтан (ТФТХЭ), н-гептан и изооктан. С практической точки зрения «удобными» растворителями являются изооктан и гептан, т.к. сероуглерод и ТФТХЭ обладают высокой летучестью, и, как следствие, растворы, приготовленные на их основе, не будут обладать должной стабильностью.

Хотя ГС признан физиологически инертным газом, но он способен разлагаться при 1100°C, причем газообразные продукты разложения гексафторида высокотоксичны и обладают резким, специфическим запахом. Среди них наиболее реакционноспособными и токсичными являются S_2F_{10} , OF_2 , SF_4 . Например, SF_4 и S_2F_{10} легко гидролизуются с образованием плавиковой кислоты и тионилфторида [53,74,83,103]:



Помимо этого, SF_6 обладает высокой реакционной способностью при радиооблучении и в сочетании с его высокой летучестью и низкой растворимостью в воде относится к «парниковым газам», поэтому эмиссия гексафторида серы в окружающую среду контролируется Киотским протоколом. Потенциал глобального потепления (GWP) для SF_6 равен 22450 [95]. Поэтому,

предельно допустимое концентрация в различных странах мира (American Conference of Governmental Industrial Hygienists; Occupational Safety and Health Administration; Deutsche Forschungs-gemeinschaft) была установлена на уровне 1000 ppm [50,51,86,92]. Однако, помимо отрицательного воздействия на экологию, ГС серы обладает рядом свойств, которые обуславливают его крупнотоннажное производство.

Интересным решением было использовать SF_6 в масс-спектрометрическом анализе с ионизацией электроспреем нековалентнообразованных белковых комплексов (например, белок-дисахарид) с целью их стабилизации. Основным механизмом, ответственным за стабилизирующий эффект при введении добавки SF_6 , является испарительное охлаждение [36].

На сегодняшний день известны примеры использования ГС в качестве подвижной фазы в сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ). Причем некоторые авторы [78, 79], обнаружили, что ГС имеет такую же элюирующую силу, что и диоксид углерода. Самменс [96] с соавторами описал взаимодействие $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ углеводородов с сверхкритическим ГС, причем было установлено, что с увеличением числа атомов углерода, т.е. с увеличением размера молекулы углеводорода, взаимодействие алкан - ГС уменьшается.

Позже, Шварцц и Броунли описали разделение модельной смеси углеводородов и образцов топлива с использованием сверхкритического SF_6 на адсорбционных набивных колонках маленького диаметра (адсорбент-силикагель) [66].

Хорошие результаты получил Визей с соавторами при разделении методом СФХ полярных соединений (метилбензоат, бензонитрил, нитробензол) используя в качестве подвижной фазы смесь $\text{SF}_6\text{-NH}_3$ в различных соотношениях [106].

Благодаря высокой химической устойчивости, очевидно ожидать, что ГС, не должен обладать значительным риском для здоровья человека. В экспериментах на животных была показана его фармакологическая инертность и низкая растворимость в физиологических жидкостях [48,70].

Акустическая активность и физиологическая инертность гексафторида серы сделали его перспективным агентом для создания лекарственных препаратов, повышающих эффективность ультразвуковых исследований. Так первые препараты на основе ГС были описаны в 1995 году [72], после чего началось их всестороннее изучение (доклинические испытания) и внедрение в клиническую практику. В настоящее время наиболее распространенным, и единственным на отечественном рынке, препаратом на основе ГС является SonoVueTM (Bracco, Италия), применяющийся как для улучшения визуализации поражений внутренних органов, так и для установления патологического функционирования некоторых органов: сердце, почки, головной мозг и др.

1.2 Методы количественного определения гексафторида серы в различных объектах

Анализ известной литературы, посвященной количественному определению SF_6 в различных объектах, показал, что подавляющее большинство предлагаемых методик основывается на газохроматографическом анализе.

1.2.1. Газохроматографическое определение гексафторида серы

Для газохроматографического определения возможно использование набивных и капиллярных колонок. Выбор того или иного варианта хроматографирования в первую очередь обуславливается природой и составом исходной пробы и целью анализа. Так при анализе газовых смесей, в которых необходимо количественное определение ГС и других компонентов (например, кислород, азот, другие фторированные производные серы) предпочтение отдается набивным колонкам с соответствующим сорбентом: молекулярные сита различного размера; силикагель, покрытый гидрофобными модификаторами (диоктил себацинат) – для фтор-производных и др. С другой стороны, при анализе галогенидов алканов и галогенидов серы, когда целью анализа является определение только лишь ГС в образце со сложной матрицей более применим метод с использованием капиллярных колонок.

В 1968 г американские ученые из Нью-Йорка использовали определение ГС в качестве газо-воздушного трейсера при анализе сточных вод. ГС был отделен от кислорода, диоксида углерода и воды на набивной колонке с силикагелем длиной 1 м, а также на активированном угле в колонке такой же длины. В качестве подвижной фазы использовали азот, который подавали со скоростью 60 мл/мин, температура колонки - 120°C, детектора - 150°C. Детектировали с использованием детектора электронного захвата (ДЭЗ) при концентрации SF_6 около 1 р.р.б [104].

Симмонс с соавт. в 1972 г исследовали возможность использования SF_6 как метеорологического трейсера при изучении перемещения воздушных масс. Для

исследования были подготовлены образцы SF_6 в воздухе комнаты и в азоте. Однако, анализ следовых количеств SF_6 в присутствии значительного количества кислорода газохроматографическим методом с детектором электронного захвата затруднен наложением хроматографических пиков кислорода и SF_6 . Несмотря на это, авторы добились успешного разделения на набивной колонке длиной 6 футов (1,829 м) на молекулярных ситах с размерами пор $5 \text{ \AA}$ (рисунок 6).

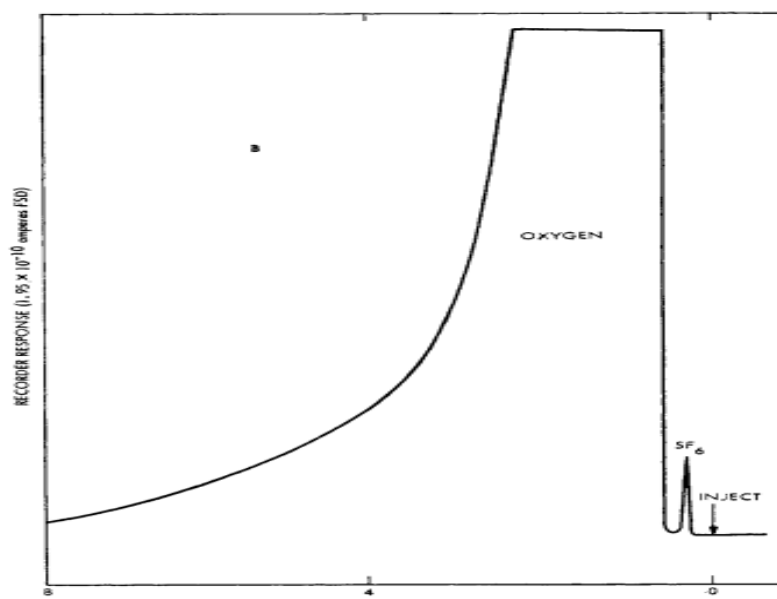


Рисунок 6 – Хроматограмма воздуха с ГС (набивная колонка – молекулярные сита $5 \text{ \AA}$)

Детектирование сигнала ГС проводили масс-спектрометрическим детектором, обнаружив молекулярный ион m/z 146 и наиболее стабильные фрагменты с m/z 127 и 89 [99].

Бельгийский ученый Деркс, изучая легочную вентиляцию-перфузию некоторых инертных газов с различной растворимостью в крови, включая гексафторид серы, определял его содержание на хроматографе Beckman 72-5 с набивной колонкой (Porapak T) длиной 6 футов (1,829 м) и ЭЗД. Были подобраны оптимальные условия определения - скорость газа носителя (гелий) 30 мл/мин, температура колонки - 70°C [48]. В этом же выпуске *Journal of chromatography* итальянские ученые Зокколило и Либерти публикуют результаты определения

содержания ГС в воздухе также с использованием ДЭЗ на набивной колонке длиной 2 м (Porapak Q), при скорости газа носителя (азот) 45 мл/мин и температуре колонки 80°C и 100°C для детектора ГС был успешно отделен от других компонентов воздуха – кислорода, углекислого газа и воды (рисунок 7) [109].

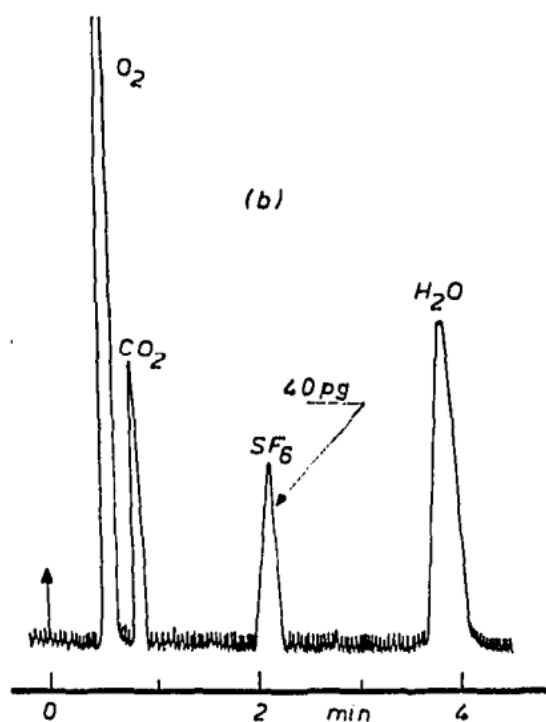


Рисунок 7 – Хроматограмма газо-воздушной смеси с ГС на набивной колонке (Porapak Q)

В 1982 году норвежскими учеными R. Heggen и M. Oehme, основываясь на результатах работы Симмонса, удалось обнаружить следы ГС и CBrF_3 в окружающем воздухе на уровне нескольких ppt. Разделение проводили в набивной колонке длиной 2,5 м на молекулярных ситах с размерами пор $5\text{\AA}$ и с детектором электронного захвата [65].

Идентичные условия газохроматографического анализа SF_6 в образцах воздуха использовали ученые из Германии, Австралии и Канады, изучая межполушарный обмен воздуха [80].

Китайские ученые проводили анализ гексафторида серы в распределительном устройстве с газовой изоляцией с целью определения побочных продуктов, которые могут образовываться в результате трансформаций ГС под действием электрического разряда или электрической искры в присутствии твердых изоляционных материалов, а также небольших количеств воды. Возможные трансформации гексафторида серы при названных условиях представленных на рисунке 8.

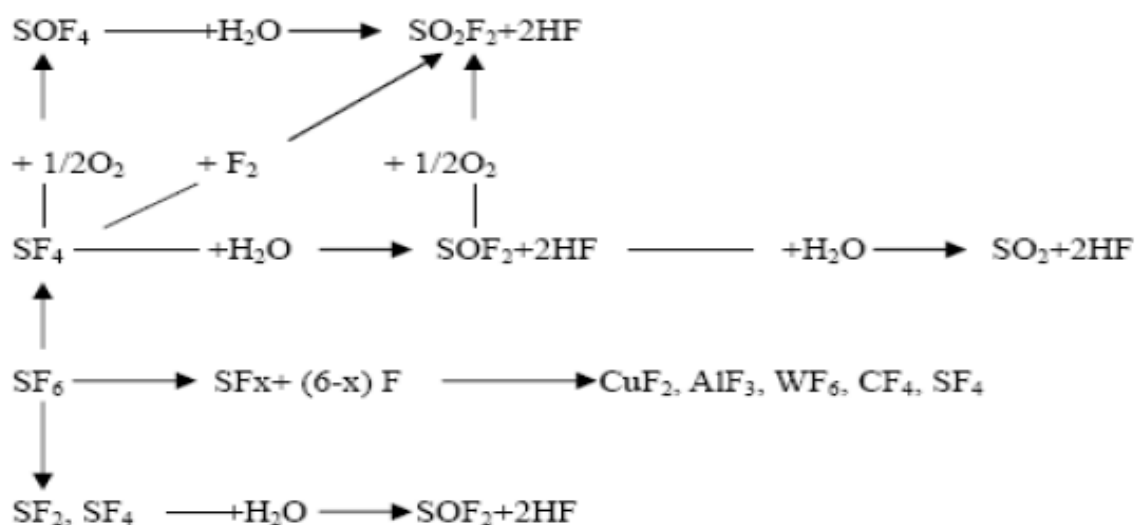


Рисунок 8 – Схема распада ГС при воздействии высокого напряжения

Анализ проводили на газовом хроматографе SHIMADZU GC-14C с использованием в качестве детектора катарометра (детектора по теплопроводности). Разделение проводили на силикагеле, покрытым слоем диоктил себагината толщиной 2 мм. В качестве подвижной фазы использовали гелий с объемной скоростью 50 мл/мин. Температура инжектора - 75°C, температура колонки - 50°C, температура детектора - 75°C. Количество CH_4 , CO_2 , SOF_2 , SO_2F_2 , S_2OF_{10} определяли унитарными методами. [56]. Через два года эти ученые описывают новый способ газохроматографического определения ГС в газовых образцах из электрических устройств.

С помощью известных детекторов не всегда можно решить все аналитические задачи. Например, детектор по теплопроводности имеет высокий

предел обнаружения, а пламенно-фотометрический детектор имеет высокую селективность в отношении серо- и фосфорсодержащих соединений, но может не детектировать другие соединения, содержащиеся в газовых образцах из электрических устройств. Xian-Sheng Zhuang описывает новый детектор, называя его универсальным, который имеет высокую чувствительность в отношении ГС (предел обнаружения на уровне ppb), а также и в отношении большинства химических соединений. В газовом образце из электрических устройств ГС был обнаружен одновременно с рядом соединений с помощью детектора с ионизацией гелия импульсным разрядом (pulsed discharge helium ionization detector PDHID) (рисунок 9) [108].

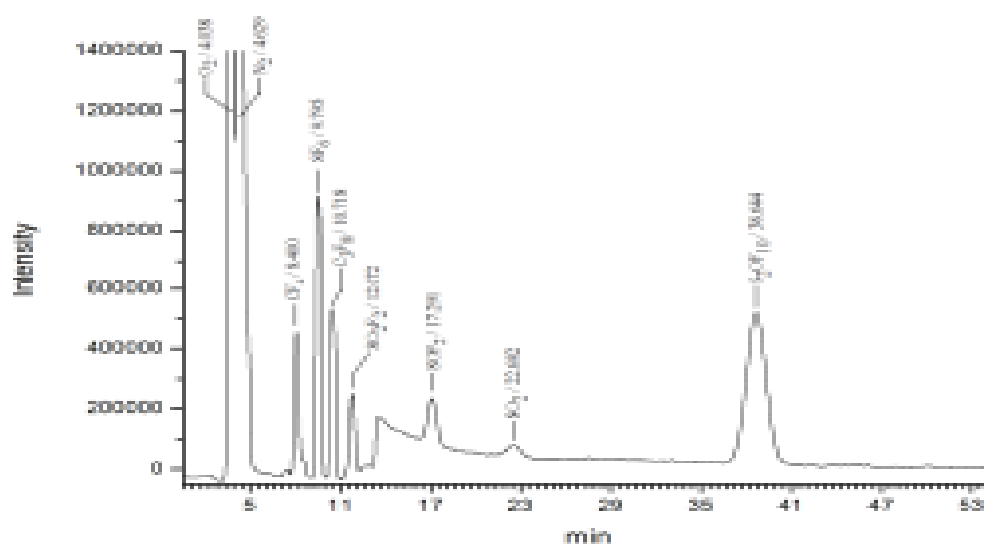


Рисунок 9 – Хроматограмма ГС с продуктами деструкции (детектор PDHID)

Такой же детектор был использован сотрудниками Sigma Aldrich Michael May et.al., которые разработали новое устройство для газового хроматографа – «jet expansion module», которое позволяет анализировать жидкие, газообразные образцы и сжиженные газы. В качестве модельных образцов газов, которые можно перевести в жидкое состояние при умеренном сжатии, ученые использовали $^{15}NH_3$ и SF_6 . Для анализа жидких и газообразных образцов был использован газовый хроматограф Agilent-6890 GC с детектором PDHID, а также для анализа сжиженных образцов оказался пригодным детектор Discharge

Ionization Detection (DID), позволяющий обнаруживать концентрации веществ на уровне sub-ppm [82].

Джеймс Олтоф с соавторами изучали возможность масс-спектрометрического детектирования следов высокотоксичного S_2F_{10} в ГС. Актуальность данного исследования обусловлена тем, что SF_6 широко используется как газовый диэлектрик в высоковольтной электропередаче и в данных условиях S_2F_{10} может образовываться из ГС действием электрического разряда. Анализ проводили на ГХ-МС Hewlett-Packard 5992A. Газохроматографическая колонка 24 фута (7.315 метра), содержащая 30% SP-2100 на 80/100 Chromosorb WAW. Подвижная фаза – гелий со скоростью 20-30 мл/мин, температура - 50°C.

Известно, что при ионизации электронным ударом при энергии уже 20 эВ наиболее значимые ионы в масс-спектре S_2F_{10} и SF_6 не отличаются, что затрудняет их детерминирование. Для решения этой проблемы авторы установили между газохроматографической колонкой и масс-спектрометром нагреваемый струйный сепаратор, в результате нагревания S_2F_{10} в присутствии SF_6 образовывал SOF_2 , масс-спектр которого уже содержал характеристичные ионы SOF_2^+ , SOF^+ , SO^+ , что позволяло его обнаруживать [88]. Несколько ранее американские ученые James M. Hanrahan и Arthur R. Paterson следы (около 1 ppm) S_2F_{10} в SF_6 обнаруживали с помощью ИК - спектрометрического детектора. Разделение проводили на газовом хроматографе Hewlett-Packard 5750B на колонке длиной 6.1 м с 30% силиконового масла на Chromosorb WAW и с детектором по теплопроводности [64].

Российские ученые Ю.Н. Новоторов и др. исследовали состав газообразных продуктов взаимодействия ГС с гидридом кальция, являющегося основой одного из способов получения элементарной серы. Количество непрореагировавшего гексафторида серы в отходящей газовой фазе по окончании реакции определяли на хроматографах «Цвет-102» и «Цвет-550» при следующих условиях:

металлическая колонка 200×0,3 см, неподвижная фаза – силикагель КСК-2.5, газ-носитель – гелий с объемной скоростью 25 мл/мин, температура колонки -55°C, температура детектора - 70°C, детекторы - пламенно-фотометрический и детектор постоянной скорости рекомбинации. Детектор по теплопроводности не мог быть применен в связи с очень низким содержанием анализируемых веществ и достаточно невысокой чувствительностью этого типа детектора. Применение пламенно-фотометрического детектора позволило зарегистрировать в анализируемой газовой фазе пять веществ, в том числе и гексафторид серы. Определение ГС проводили методом абсолютной калибровки, стандартные растворы гексафторида серы в водороде готовили методом последовательного разбавления. Авторы делают вывод, что наиболее полная информация о составе анализируемой газовой смеси может быть получена с использованием пламенно-фотометрического детектора [26].

Масс-спектрометрическое детектирование применяли и российские ученые, анализируя ГС обогащенный изотопом ^{34}S . Анализ проводили с использованием хромато-масс-спектрометра Agilent 6890-MSD 5973N. Масс-спектры записывали в режиме ионизации электронным ударом (энергия электронов 70 эВ). Примеси разделяли на капиллярной адсорбционной колонке GC-GasPro 60 м × 0,32 мм с модифицированным силикагелем, а также в колонке 25 м × 0,26 мм с политриметилсилилпропином. Газ-носитель – гелий с линейной скоростью 30 см/с. Температурный режим с 30°C до 130°C с градиентом 10°C/мин. Масс-спектрометрически было идентифицировано 23 примеси, из которых 18 веществ были обнаружены впервые. Пределы обнаружения примесей составили $1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-8}$ мол%. Авторы утверждают, что адсорбционная колонка позволяет определять примеси с невысокими молекулярными массами, а распределительная – с большими. Таким образом, применение двух колонок позволяет определять все обнаруженные примеси. Правильность результатов определения подтверждали методом варьирования величины пробы [21].

При анализе содержания «парниковых газов» - N_2O , CH_4 , SF_6 в северо-восточной Индии был использован газовый хроматограф Agilent 6890N с пламенно-ионизационным детектором (CH_4) и детектором электронного захвата (N_2O , SF_6). Первоначально N_2O и SF_6 были отделены от воздуха на предколонке $0,3 \text{ м} \times 0,476 \text{ см}$ и основной колонке $0,61 \text{ м} \times 0,476 \text{ см}$ Porapak Q 80/100, а затем N_2O и SF_6 были разделены на колонке с молекулярными ситами $5\text{\AA}$ (40/60) $0,91 \text{ м} \times 0,318 \text{ см}$ [57].

Клоком с соавторами описана методика пробоподготовки образцов крови для определения ГС, основанная на вакуумной экстракции аналита из образца крови и анализе газовой фазы методом ГХ-ЭЗД. Данная методика имеет диапазон линейности $0,01 - 1 \text{ мкл/мл}$ [73] и повторяемость $2,3 - 3,8 \%$, для ГС растворенного в крови. Однако, аппаратное оформление подобной пробоподготовки сделает ее трудо- и время затратной.

Вышеописанные статьи дают представление об основных тенденциях, используемых в анализе различных объектов на содержание SF_6 , которые заключаются в аппаратном усложнении, использовании последовательных хроматографических колонок с разной природой неподвижной фазы. Анализ ряда литературных источников систематизирован и представлен в виде таблицы (таблица 2).

Таблица 2 – Описанные в литературе методы газохроматографического определения ГС

Детектор	Объект анализа	Условия	Метрологические характеристики	Ссылка
PDHID	Воздух	$3 \text{ м} \times 3,2 \text{ мм}$ MC 13x (150-180 мкм) $3 \text{ м} \times 3,2 \text{ мм}$ Super Q 150 – 180 мкм	LOD 1,5 ppm Lin 0,018- 13,25 мкг/л	77, 93
ЭЗД	SF_6	$0,38 \text{ м} \times 6 \text{ мм}$	LOD 0.05 ppb	100

Детектор	Объект анализа	Условия	Метрологические характеристики	Ссылка
		Al ₂ O ₃ (100 -120 мкм)	Lin 0.1 – 200 ppb Точность ±4.8 %	
ЭЗД	Воздух	2 м × 3,7 мм Порапак-Q (80-100 мкм) Азот (CO ₂)	Lin 1 – 10 ppt σ _R 0,02 ppt	63
ЭЗД	Воздух	0,3 м × 3,2 мм MS-5A; 2,4 м * 3,2 мм Carbopack B (1% Sp-1000) 60 – 80 мкм	LOD 0.5 ppt	45
ЭЗД	Воздух	1/8 inch Baymal 40-60 мкм Аргон (5% водород) V = 0.5 mL	LOD 1×10 ⁻¹⁴ Lin 0.01 – 2.5 ppb	43
ЭЗД	Воздух	17 фт × 1/8 инч MS-5A	LOD 4×10 ⁻¹³ мл/мл	49
ЭЗД	Вода	1 м × 10 мм MS-5A Азот V = 20 мл	LOQ 1×10 ⁻¹⁶ М LOD 0,1 пкмоль/л Повторяемость ±6%	97
ЭЗД	Вода	1,22 м × 3,75 мм Altech MS-5A V = 0,25 мл	LOQ 100пкг/л	68
ПФД	Воздух	10,02 м × 2.16 мм Chromosorb T полифенил-эфир (12%) H ₃ PO ₄ (0.5%) 0,3 м × 2,16 мм	LOD 0,5 мкг/л	38

Детектор	Объект анализа	Условия	Метрологические характеристики	Ссылка
		Deactigel (120 – 140 мкм) $V = 0,1 \text{ mL}$		
МСД (ХИ)	Воздух	$12f \times 1/8 \text{ in}$ MS-5A 60 – 80 мкм $V = 1 \text{ мл}$	LOQ 3 ppb Lin 10000 – 7 ppb Повторяемость 4 %	71
МС	Воздух/ Жидкость	$20 \text{ м} \times 0,2 \text{ мм} \times 0,33 \text{ мкм}$ HP-5 Temp -30 - -60 °C 50 мкл	н/а	75
ЭЗД	Вода	$60 \text{ м} \times 0,32 \text{ мм}$ GS-GasPro Гелий	LOD $2 \times 10^{-12} \text{ мл}$ Повторяемость 4,3 – 6,7 %	41
ЭЗД	Воздух	$50 \text{ м} \times 0,22 \text{ мм} \times 0,6 \text{ мкм}$ OV-101 -40 – 80 8°C /мин $50 \text{ м} \times 0,32 \text{ мм}$ SiO ₂ AlKCl ₄ 80 – 200 10°C /мин	н/а	85
ЭЗД		$30 \text{ м} \times 0,32 \text{ мм}$ GS-GasPro Азот Изотерма 70 °C	LOD 25 ppt Lin 25 ppt – 1 ppm	59
ЭЗД	Кровь	$4 \text{ м} \times 1/4 \text{ in.}$ Porapak T (40-100 mesh) 40 ml/min	Lin 0,01 – 1 мкл/мл Повторяемость 2,3-3,8 %	73

Обзор литературы по газохроматографическому определению гексафторида серы показывает, что разделение газовых смесей, содержащих ГС, может быть достигнуто на насадочных и капиллярных колонках, с использованием в качестве неподвижной фазы как адсорбентов (цеолитов, силикагеля и др.), так и жидких фаз (вариант распределительной хроматографии). Однако, эффективность насадочных колонок не высока, что приводит к увеличению времени анализа и недостаточно низкими пределами обнаружения. В то же время, анализ литературных данных показывает, что детектирование SF_6 в различных по составу объектах может быть произведено с использованием широкого круга детекторов – ЭЗД, МС, ИК, ДТП, PDHID. Выбор условий хроматографического анализа среди названных выше обуславливается исключительно составом анализируемого объекта и количественным содержанием в нем ГС. Наибольшей чувствительностью обладает ДЭЗ, использование которого сопряжено с некоторыми трудностями, связанные с вводом пробы, обуславливающиеся крайне высокой чувствительностью детектора к примесям в составе пробы и газе-носителе и относительно узким линейным динамическим диапазоном. Для определения серосодержащих соединений широкое применение нашел пламенно-фотометрический детектор, однако сведений о его использовании в количественном определении ГС в литературе не найдено [26].

1.2.2. Иные методы определения гексафторида серы

В литературе есть единичные упоминания использования других методов определения ГС, так в воздухе предложено проводить определение методом ИК-спектроскопии по аналитическому волновому числу $947,9\text{ см}^{-1}$ [94]. Другими авторами предложен сенсор для определения гексафторида в воздухе, принцип действия которого основан на каталюменесценции с диапазоном линейности 8 – 5600 мг/л и пределом обнаружения 6,2 мг/л [47].

При клинических испытаниях препаратов на основе ГС в экспериментах по изучению фармакокинетики использовалась линейная зависимость между интенсивностью акустического сигнала и концентрацией препарата [67, 84, 107]. В исследовании [67] было показано, что линейная зависимость является функцией температуры, при которой происходит измерение и наблюдается в концентрациях ниже 1,5 мг/л (при $+20^{\circ}\text{C}$) и ниже 1,0 мг/л (при $+4^{\circ}\text{C}$), однако в тех же источниках отсутствует информация о других характеристиках методики.

1.3. Методы пробоподготовки крови при определении газов

Определение содержания газообразных веществ в крови – задача, которую изучают с середины XX века. Благодаря развитию физико-химических методов анализа стало возможным определение газообразных веществ в биологическом материале, что позволило контролировать многие биохимические параметры нормального состояния организма и отдельных систем.

Согласно литературным данным, наибольшее внимание аналитиков уделено методам определения «физиологических газов»: углекислому, угарному, кислороду и некоторым другим, что обусловлено их ролью в биохимических процессах. Так, различные формы CO_2 входят в состав гидрокарбонатного буфера крови, т.е. поддерживает рН крови постоянным, O_2 – источник энергии для биологических процессов; CO – кровяной яд.

Из анализа литературы, посвященной методам пробоподготовки образцов крови и плазмы для целей химического анализа можно сделать вывод об общих принципах работы и различиях, обуславливающих различной природой аналита.

Прямой и быстрый хроматографический метод определения угарного газа описан Коллисом с соавторами [46], согласно которому не требовалось вакуумирования образца или его повторного растворения. Для анализа использовалась набивная колонка, где в качестве неподвижной фазы выступали молекулярные сита 30 – 80 мкм с диаметром пор 5 Å.

В анализе цианидов была применена дериватизация (перевод в цианидхлорид) с последующим хроматографированием на колонке CP Sil 8B метилсиликон (50м×0,23мм×0,12мкм). Это слабополярная колонка с возможностью анализа большого многообразия веществ. Пробоподготовка заключалась в отборе 5 мл крови и растворении в воде в соотношении 1:20. Для перевода цианида в молекулярную форму к полученному раствору было добавлено 100 мкл фосфорной кислоты. В раствор были помещены специальные пробирки, содержащие 1 мл 0,5%-ного водного раствора хлорамина. Далее

проводили инкубирование в течение 90 минут при температуре 65°C. Линейность методики составила 5 – 1000 мкг/л, LOQ 100 мкг/л, LOD 5 мкг/л, повторяемость 1 – 8% [87]. Однако, из-за высокой устойчивости ГС невозможно предположить удобный способ его дериватизации.

При определении монооксида углерода применили нагревание образца крови с последующей обработкой водным раствором калий гексацианоферрата (II). Хроматографировали на набивной колонке с молекулярными ситами 60-80 мкм, 5 Å [61].

В работе Чилдреса с соавторами [42] диапазон линейности для многих газообразных веществ составил 4-20 ммоль/л (детектор по электропроводности).

Для определения инертных газов в крови Томонага с соавторами [102] предложили использовать известные методы определения инертных газов, описанных в геохимических публикациях [40,41]. Томонага предложил модифицировать эти методы для возможности применения при работе с биологическими образцами. Метод заключается в центрифугировании образца крови для отделения форменных элементов с последующим вакуумированием надосадочной жидкости. Авторы [58] утверждают, что для высвобождения растворенных газов из крови можно использовать специальные вакуумные установки, выдерживающие давление менее 13,3 Па (0,1 мм рт ст). Этот способ и был применен Клоком при определении ГС в крови, однако сложность аппаратного оформления делает крайне затруднительным использовать его в потоковом анализе.

В экспериментах по газохроматографическому определению перфторуглеводородов в биологических образцах [44, 105] предложено проводить анализ крови без предварительной процедуры вакуумирования образцов, а с помощью автоматического устройства ввода газовой фазы, находящейся в вiale над образцом крови, дегазация которой достигается действием нагревания. Предел количественного определения такого способа составляет 0,05 нг/г с повторяемостью 3,1 % и точностью 11 %. Однако, помимо большого объема введения образца (1 мл газовой фазы), предлагаемый метод требует специального

оборудования для осуществления автоматического ввода, что делает затруднительным применение для определения ГС в потоковом анализе.

Таким образом, нами не было найдено описания в литературе алгоритма пробоподготовки крови, не требующего дорогостоящего специального оборудования для ввода образца или систем пробоподготовки. Поэтому разработка простого алгоритма пробоподготовки образцов крови, который будет заложен в основу методики определения ГС является актуальной задачей химического анализа.

1.4. Методы количественного анализа в газовой хроматографии

Как правило, газохроматографическое определение различных веществ осуществляется с применением метода внутреннего стандарта. В качестве последнего обычно используется соединение, по своей структуре подобное определяемым веществам и имеющие близкие к ним физико-химические газохроматографические и масс-спектральные характеристики [4]. Внутренние стандарты бывают двух родов: стандарты – имитаторы и собственно внутренний стандарт. Имитаторы служат для определения концентрации определяемых компонентов, моделируя их поведение в процессе пробоподготовки и анализа, они добавляются перед началом анализа в процессе пробоподготовки или при определенных процедурах пробоподготовки. Истинные внутренние стандарты служат для контроля всего процесса анализа – от качества пробоподготовки до работы аппаратуры.

В газовой хроматографии для количественного анализа в основном используются методы абсолютной градуировки, внутренней нормализации и внутреннего стандарта [13]. Метод абсолютной градуировки основан на раздельном дозировании в хроматограф определенных количеств анализируемой пробы и образца сравнения с последующим сопоставлением площадей пиков, различают несколько его модификаций [25]: метод прямого сравнения и метод калибровочной прямой. В «классическом» варианте метод внутреннего стандарта предусматривает добавление к известному количеству анализируемой пробы определенного (измеренного) количества не содержащегося в исходном образце эталонного вещества (внутреннего стандарта) и последующее хроматографирование приготовленной смеси. Его вариантом является метод стандартной добавки, в котором в качестве стандарта используют вещество уже присутствующее в анализируемой смеси.

В то же время, проведение анализа реальных образцов природных объектов, представляет собой сложную задачу в связи с присутствующими и мешающими

определению компонентами пробы (матрицей). Возможными вариантами повышения надежности результатов анализа на уровне следовых концентраций при пробоподготовке служат селективная экстракция, дериватизация и применение внутреннего стандарта [2].

Другой интересной модификацией метода внутреннего стандарта является, впервые предложенный М.С. Вигдергаузом, метод двойного внутреннего стандарта [14, 21]. Принцип метода заключается в том, что анализируемый образец вносят не одно, а два стандартных соединения, которые элюируются перед и после определяемого вещества. Применение двух стандартных веществ для определения содержания в образце целевого компонента позволяет значительно увеличить воспроизводимость и правильность результатов анализа. Основными достоинствами этой модификации метода внутреннего стандарта являются нивелирование случайной составляющей погрешности и получение возможности пренебрегать наибольшими различиями в численных значениях калибровочных множителей, если стандартные вещества и определяемый компонент имеют близкие химическую природу и молекулярный вес.

Компенсировать потери определяемого соединения на стадии пробоподготовки можно введением стандартов в исходные образцы. Из всех методов количественного хроматографического анализа в этом случае могут быть использованы только два: внутреннего стандарта и стандартной добавки [15].

В аналитической практике гетерогенные образцы встречаются весьма часто, например, в виде суспензий и эмульсий, а также смесей, дополнительно содержащие компоненты, которые обладают сорбционными свойствами. Непосредственное дозирование таких образцов в хроматографические колонки нежелательно, так как приводит к искажению результатов. При анализе подобных образцов на стадии подготовки пробы рекомендуют трансформацию исходных образцов в гетерофазные системы [15,25], в которых анализируемые соединения распределены в соответствии с коэффициентами распределения, а мешающие

компоненты матрицы сосредоточены в одном из слоев. При этом анализируют наиболее подходящий слой полученных гетерофазных систем.

Характеристика методов количественного хроматографического анализа в сравнении по критериям их применимости к образцам со сложным составом как необходимость использования дополнительного оборудования, вспомогательных операций подготовки проб или градуировки, возможность определения содержания аналита в образцах вне зависимости от их объема, эффекты компенсации неполноты извлечения аналитов из матрицы и оценка затрат времени приведены в таблице 3 [14]

Таблица 3 - Сравнительная характеристика методов количественного хроматографического анализа по критериям их применимости к образцам со сложной матрицей [14]

Метод анализа	Необходимость использования специального оборудования	Необходимость дополнительных операций (приготовление дополнительных проб, градуировка) или образцов	Возможность определения суммарного содержания аналита в исходном образце без учета его объема	Компенсация неполноты извлечения аналитов из исходных образцов	Затраты времени
Внешнего стандарта	Нет	Есть	Нет	Нет	Низк
Абсолютной градуировки	Нет	Есть	Нет	Нет	Выс
Внутреннего стандарта	Нет	Есть	Нет	Нет	Низк
Изотопного разбавления	Есть	Есть	Есть	Есть	Низк
Внутренней нормализации	Нет	Нет	Нет	Нет	Низк
Стандартной добавки	Нет	Нет	Есть		Низк
Последовательных стандартных добавок	Нет	Есть	Есть	Есть	Выс

Метод анализа	Необходимость использования специального оборудования	Необходимость дополнительных операций (приготовление дополнительных проб, градуировка) или образцов	Возможность определения суммарного содержания аналита в исходном образце без учета его объема	Компенсация неполноты извлечения аналитов из исходных образцов	Затраты времени
Стандартных добавок в гетерофазные системы	Нет	Есть	Есть	Есть	Сред
Двойного внутреннего стандарта	Нет	Нет	Есть	Есть	Сред

Во многих руководствах декларированы требования к внутреннему стандарту, основными из них являются: инертность к компонентам пробы, способность смешиваться с компонентами, полное хроматографическое разделение с определяемыми соединениями и, в то же время, не слишком большие различия в параметрах удерживания [14]. Таким требованиям отвечают в основном гомологи определяемых соединений, в том числе изотопно-меченные.

Преимуществом использования метода внутреннего стандарта является в том, что минимизируются погрешности результатов анализа, вызванные случайным изменением основных параметров хроматографического эксперимента (температура колонки, состав и скорость подвижной фазы, режим работы детектора), потому что отклонения условий будут похожим образом влиять на качественные и количественные параметры хроматографических пиков всех веществ пробы (и определяемых и стандартных). Кроме того, не нужно знать абсолютное количество вводимой пробы.

Условия хроматографирования должны обеспечивать полное разделение пиков анализируемого и стандартного соединений, при этом все остальные компоненты смеси, не представляющие интереса при анализе, могут вообще не

отделяться друг от друга или же вообще не проявляться на хроматограмме (в этом заключается преимущество данного метода по сравнению с методом внутренней нормализации).

Выбор внутреннего стандарта руководствуется следующими требованиями[23]:

1. Вещество-стандарт должно полностью смешиваться с анализируемой пробой и должно быть инертно и к ее компонентам, и к используемым подвижным и неподвижным фазам.
2. Концентрацию вещества-стандарта в анализируемой пробе нужно подбирать таким образом, чтобы отношение площадей пиков стандарта и анализируемого компонента было близким к единице.
3. В рабочих условиях проведения анализа пик вещества-стандарта должен располагаться на хроматограмме по близости от пиков анализируемых соединений.

Из вышесказанного можно предположить, что из всего многообразия существующих веществ не найдется такое, которое бы отвечало всем предъявляемым требованиям к внутреннему стандарту.

Выводы по главе 1.

1. Большинство методов определения ГС основываются на газохроматографических способах с различными типами детекторов.
2. Детектор электронного захвата обладает высокой чувствительностью, но низким динамическим диапазоном линейности по отношению к ГС, что делает его не пригодным в разработке методик, предполагающих определение ГС в широком диапазоне концентраций.
3. Выбор внутреннего стандарта при определении ГС является не тривиальной задачей в виду отсутствия устойчивых, не токсичных фторпроизводных серы и в связи с труднодоступностью изотопно-меченных гомологов.
4. Мировые тенденции при анализе образцов со сложной матрицей заключаются в том, что усложняется аппаратная часть (применение вакуумирования, термоэкстракции образцов) и параллельно выстраивают несколько хроматографических колонок с различной природой неподвижной фазы, что делает предлагаемые методики труднодоступными для внедрения в широкий круг лабораторий.
5. Предложенная акустическая методика определения содержания ГС в крови, ограничена тем, что акустический сигнал регистрируется лишь от того гексафторида серы, который заключен в мицеллу лекарственной формы, и не позволяет оценить реальную концентрацию ГС в крови.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, АППАРАТУРА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Описание реактивов, стандартных образцов и материалов

Для разработки методики количественного определения гексафторида серы в крови и проведения ее метрологической оценки были использованы следующие реактивы:

Вода деионизированная.

Гексафторид серы «Элегаз, повышенной чистоты», поставляемый компанией ООО «Галополимер Кирово – Чепецк» ТУ 6-02-1249-83 с изм. 1, 2, 3, 4, 5, 6. Характеристика серы гексафторида представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристика гексафторида серы повышенной чистоты (ТУ 6-02-1249-83 с изм. 1, 2, 3, 4, 5, 6.)

Параметры	Норма
Массовая доля SF ₆ , %, не менее	99,9
Массовая доля примесей (кислород, азот, воздух), %, не более	0,04
Тетрафторметан, %, не более	0,04
Массовая доля воды, %, не более	0,0015
Кислотность в пересчете на массовую долю HF, %, не более	0,00003
Массовая доля гидролизуемых фторидов в пересчете на массовую долю HF, %, не более	0,0001
Токсичность	не токсичен

Гептан эталонный (х.ч., ГОСТ 25828-83) осушался над пентоксидом фосфора.

Четыреххлористый углерод химически чистый (ГОСТ 20288-74, ГСО 7814-2000).

Толуол (ГСО 7814-2000).

Этилацетат (х.ч., ГОСТ 22300-76).

Бензол (х.ч., ГОСТ 5955-75).

Весы аналитические GR-120 (I класс точности по ГОСТ OIML R 76-1-2011)

Механические дозаторы Thermo Scientific «Ленпипет».

Колбы мерные: 10, 25, 50, 100 мл (1 класс точности, по ГОСТ 1770-74)

Газовый хроматограф Agilent 7860A с масс-спектрометрическим детектором (МСД) Agilent 5975.

Использованные в работе капиллярные колонки для газовой хроматографии и их характеристики приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика использованных хроматографических колонок

Тип колонки	Неподвижная жидкая фаза
HP-1MS	100%-метил-полисилоксановая фаза, длина 30 м, диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм
HP-5MS	5%-фенил-95%-метил-полисилоксановая фаза, длина 30 м, диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм
HP-INNOWAX	Полиэтиленгликоль, длина 30 м, диаметр 0,53 мм, толщина пленки 1,00 мкм

Для обработки данных использовали программное обеспечение ChemStation (G1701EA E.02.02.1431, Agilent Technologies, США).

2.2. Приготовление растворов

2.2.1. Выбор экстрагента и приготовление раствора гексафторида серы

Для наилучшего извлечения ГС из матрицы образца в качестве экстрагента необходимо использовать растворитель, в котором ГС хорошо растворяется (таблица 6).

Таблица 6 – Растворимость ГС при 20 °С, 1 атм.

Растворитель	Мольная доля, $\times 10^4$
Вода (H_2O)	0,05
Плавиковая кислота (HF)	1,3
Гексафторбензол (C_6F_6)	26,4
н-гептан (C_7H_{16})	100,55
Изооктан (C_8H_{18})	153,5
Толуол ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$)	33,95
Метилциклогексан ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{-CH}_3$)	70,15
Перфторгептан (C_7F_{16})	224,4
Тетрахлорметан (CCl_4)	65,54
1,1-Дифтор-2,2-дихлорэтан ($\text{C}_2\text{F}_2\text{Cl}_2$)	278,6
Сероуглерод (CS_2)	9,25
Трибутиламин ($(\text{C}_4\text{H}_9)_3\text{N}$)	731,0
Метилгидразин ($\text{NH}_2\text{-NH-CH}_3$)	2,11
Нитрометан ($\text{CH}_3\text{-NO}_2$)	10,0

Однако, при выборе рабочего растворителя необходимо учитывать не только растворимость аналита в нем, но и его физико-химические свойства (таблица 7).

Таблица 7 – Физические свойства «хороших» растворителей.

Наименование	T _{кип}	XLogP3	Индекс Ковача
н-гептан (C₇H₁₆)	98,42	4.4	700
Изооктан (C₈H₁₈)	99.3	3.8	687.5
Перфторгептан (C ₇ F ₁₆)	82,5	5.8	300
1,1-Дифтор-2,2-дихлорэтан (C ₂ F ₂ Cl ₂)	19	2.4	454
Трибутиламин ((C ₄ H ₉) ₃ N)	216,5	4.0	1192

Таким образом, наилучшими растворителями для разработки методики определения ГС являются гептан и изооктан, однако стоимость последнего в разы превосходит стоимость н-гептана того же качества (Sigma-Aldrich). Поэтому целесообразнее вести разработку методики на более дешевых растворителях – гептан, циклогексан.

Насыщенный раствор готовили путем интенсивного барботирования гексафторидом серы (объемная скорость 8 л/мин) 100 мл гептана в течение 15 минут. Концентрация насыщенного раствора гексафторида серы в гептане составляет 1608 мкл/мл [27].

Для проверки содержания ГС в насыщенном растворе проводили гравиметрическое определение, которое показало, что подобранные условия продувки позволяют насытить гептан в течение 3 минут и концентрация полученного раствора составляет $71,3 \pm 0,7$ ммоль/дм³ (таблица 8).

Таблица 8 – Исходные данные гравиметрии при растворении SF_6 (n=3).

[illegible]

где, m_k – масса пустой колбы; m_{k2} – масса колбы с гептаном; m_{k3} – масса колбы с гептаном, насыщенным SF_6 ; V_k – объем гептана в колбе (гравиметрически).

2.2.2. Изучение стабильности насыщенного раствора гексафторида серы.

Изучение стабильности насыщенного раствора при хранении в открытом сосуде показало (рисунок 10), что в течение 2 дней концентрация ГС падает в 2 раза, а по истечении 5 дней происходит полное удаление ГС из гептана.

Определение времени пригодности насыщенного раствора для приготовления градуировочных и стандартных растворов заключалось в изучении стабильности в первые 5 часов от момента приготовления.

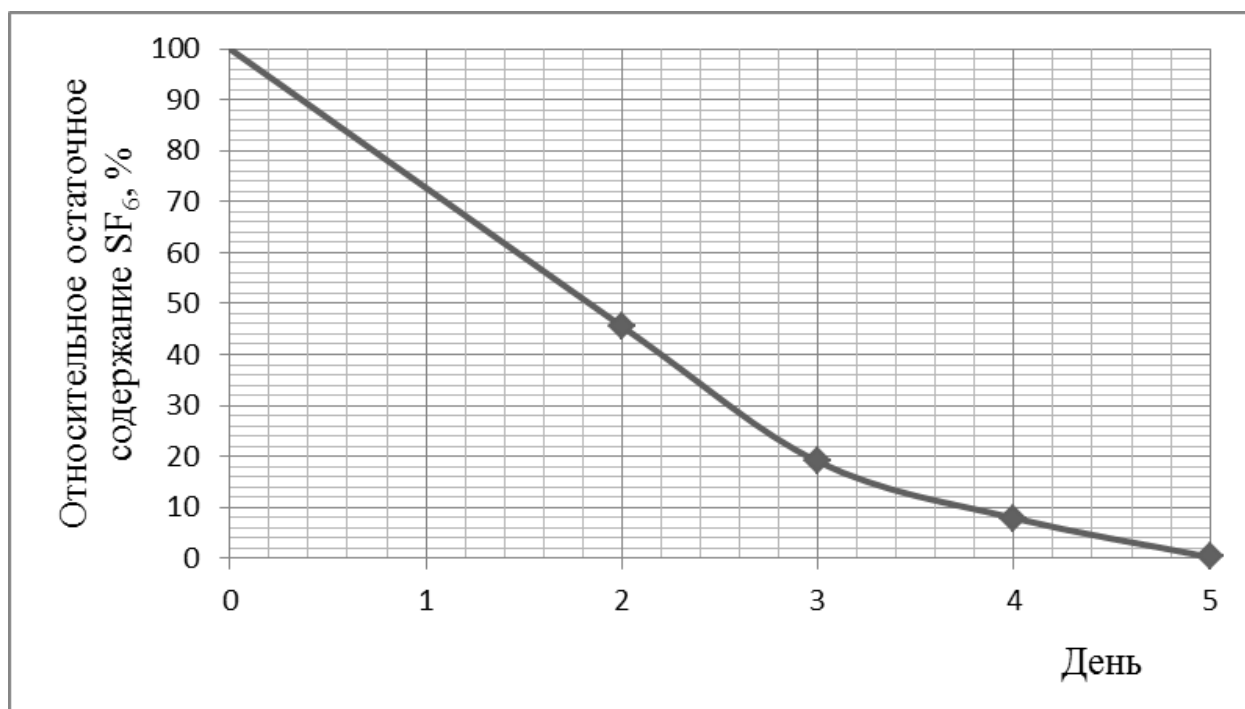


Рисунок 10 – График зависимости содержания ГС в растворе гептана при долгосрочном изучении стабильности

Краткосрочное изучение стабильности насыщенного раствора ГС (рисунок 11) позволяет определить время пригодности его использования – 30 минут, за которое содержание ГС снижается на 1 %, что сопоставимо с погрешностью приготовления самого раствора ГС.

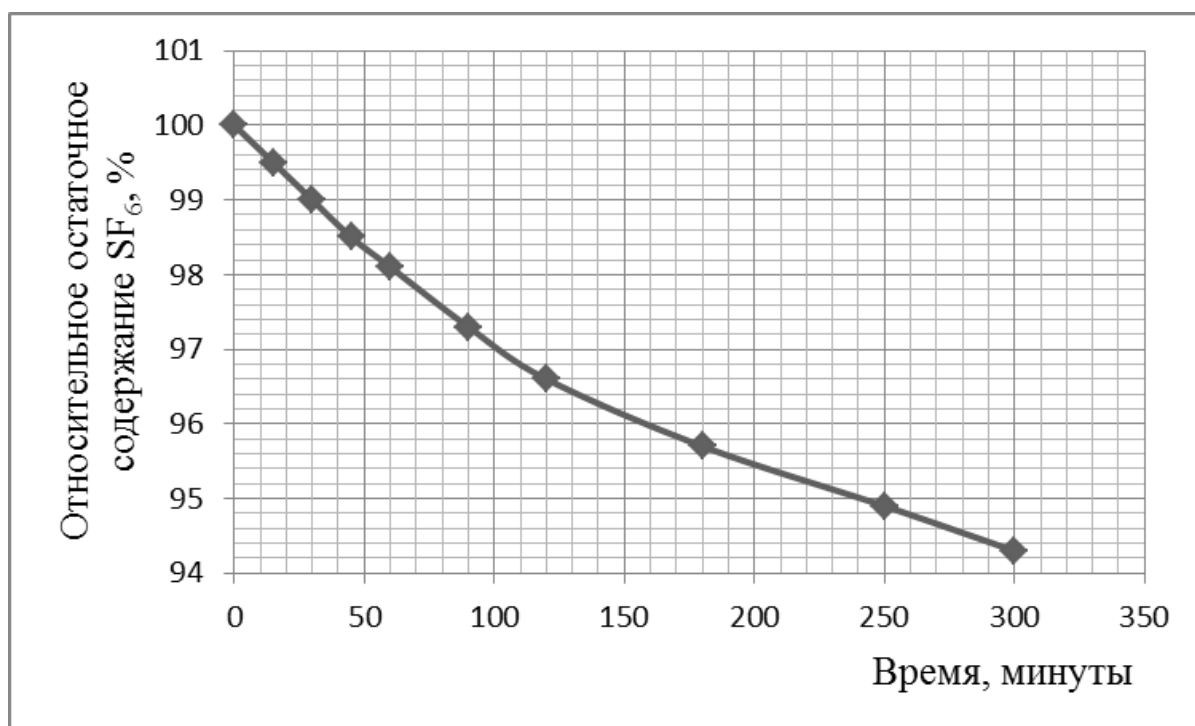


Рисунок 11 – График зависимости содержания ГС в растворе гептана при краткосрочном изучении стабильности.

Таким образом, изучение стабильности позволило определить время пригодности насыщенного раствора для приготовления градуировочных растворов ГС на его основе.

2.2.3. Приготовление растворов внутреннего стандарта и калибровочных образцов

В мерную колбу, вместимостью 10 см³ помещают 0,5 см³ насыщенного раствора и доводят объем колбы до метки гептаном (C₀).

Затем 0,154 см³ раствора C₀ с помощью дозатора помещают в мерную колбу вместимостью 10 см³ и доводят объем колбы до метки гептаном, концентрация гексафторида серы 55 мкмоль/дм³ (градуировочный раствор).

Рабочие градуировочные растворы гексафторида серы готовят путем разведения градуировочного раствора гексафторида серы (55 мкмоль/дм³) и раствора внутреннего стандарта (500 мкмоль/дм³), как указано в таблице 9.

Таблица 9 – Приготовление рабочих градуировочных растворов.

Маркировка рабочего градуировочно го раствора	Концентрация гексафторида серы, мкмоль/дм ³	V градуировоч ного раствора гексафтори да серы, см ³	V раствора внутреннего стандарта (500 мкмоль/дм ³) Б, см ³	V колбы, см ³
ГР 1	15	2,732	0,1	10
ГР 2	10	1,821	0,1	10
ГР 3	3	0,546	0,1	10
ГР 4	1,5	0,273	0,1	10
ГР 5	0,3	0,546	1	100
ГР 6	0,15	0,273	1	100
ГР 7	0,12	0,219	1	100
ГР 8	0,09	0,164	1	100
ГР 9	0,06	0,109	1	100

Вносят 1 см³ рабочего градуировочного раствора с помощью дозатора в хроматографическую вialу вместимостью 2 см³, вialу плотно закрывают крышкой с тефлоновой прокладкой.

Срок хранения растворов 10 часов при температуре (20±3) °С.

2.4 Оборудование

Для подбора рабочих условий анализа хроматографию проводили в изотермическом режиме в диапазоне температур +30 – +70 °С. Детектирование проводили в режиме селективного ионного мониторинга (SIM). В качестве газа-носителя использовали гелий, поток газа в колонке 1 мл/мин. Температура испарителя 150 °С, режим ввода пробы – без деления потока, объем вводимой пробы 1,0 мкл.

Температура источника ионов – 100-250 °С, температура квадруполь – 150 °С, энергия ионизации - 70 эВ. Запись хроматограмм осуществляли в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по выделенным ионам – 127 m/z для гексафторида серы и 92 m/z для внутреннего стандарта – толуола, для увеличения отношения сигнал/шум из-за большего времени накопления данных для интересующих ионов [1]. Главное преимущество режима селективного сканирования ионов заключается в меньшей затрате времени на детектирование ионов, не представляющих интерес для анализа, в результате чего достигаются более низкие пределы обнаружения [1, 22].

2.5. Методы изучения фармакокинетики

Лекарственное средство ГС было в виде лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций. Растворяли в 5 мл 0,9% раствора натрия хлорида, гексафторида серы было не менее 0,5 мкл/мл.

Дозы – лекарственное средство вводили животным однократно в дозе 15 мкл/кг и 4 мкл/кг полученного раствора крысам и кроликам. Кроликам также вводили три уровня доз 4 мкл/кг, 6 мкл/кг и 8 мкл/кг для изучения дозозависимости фармакокинетики ГС.

Для изучения фармакокинетики ГС лекарственный препарат вводили внутривенно.

Для отбора проб биологического материала, кровь помещали в пробирки для крови с добавлением антикоагулянта (цитрат), после чего помещали в морозильную камеру. Перед анализом пробы размораживали при комнатной температуре, отбирали навеску 1 см³, помещали в стеклянную пробирку, добавляли 2 мл раствора внутреннего стандарта в гептане (5 мкмоль/дм³) и помещали в лабораторный смеситель типа «вортекс» на 20 секунд при не менее 2000 об/минуту, после чего раствор центрифугировали и помещали гептановый слой в плотно закупоренную вials.

Изучение фармакокинетики лекарственного средства проводили согласно общепринятым подходам [30].

Расчет кинетических параметров ГС в крови крыс и кроликов проводили модельным способом путем построения двучастевых моделей и рассчитывали следующие фармакокинетические параметры:

площадь под экспериментальной кривой концентрации гексафторида серы в крови за исследуемый период – AUC;

общий клиренс – Cl;

кажущийся объем распределения гексафторида серы – V_d;

период полувыведения гексафторида серы – T_{1/2};

среднее время удерживания гексафторида серы в организме – MRT;

константа элиминации – k_{el} .

Для вычисления Cl и KeI конечный (моноэкспоненциальный) участок фармакокинетической кривой описывали с помощью линейного регрессионного анализа.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводили методами вариационной статистики с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. Вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Различие двух сравниваемых величин считалось достоверным в том случае, если вероятность их тождества была меньше 5 % ($P < 0,05$). В случаях нормального распределения признаков для статистической оценки применяли параметрический t -критерий Стьюдента. При больших отклонениях распределений признака от нормального вида для независимых выборок был использован непараметрический критерий U -критерий Уилкоксона-Манна-Уитни. Для выявления достоверности различий качественных показателей использовался критерий углового преобразования Фишера.

Глава 3. Разработка методики количественного определения гексафторида серы в крови методом ГХ-МС

3.1. Хроматографическое поведение гексафторида серы и его детектирование

3.1.1. Подбор условий ГХ-системы для определения гексафторида серы

Исходя из структурных особенностей, летучести, достаточно низкой реакционной способности и на основании литературного обзора, определение ГС проводят с использованием насадочных колонок, что позволяет добиться (вследствие высокой селективности) хорошего разделения между пиками ГС и компонентов воздуха. Существенным недостатком использования насадочных колонок в клиническом анализе является большой объем пробы и время анализа. Предлагаемый метод газовой хроматографии для определения ГС при фармакокинетических исследованиях УЗИ контрастного препарата с использованием капиллярной колонки позволяет снизить время анализа, расход газа-носителя и нагрузку на элементы масс-детектора, что в свою очередь дает возможность внедрить данную методику в клиническую практику.

Ограничением метода газовой хроматографии является невозможность варьировать состав подвижной фазы, и оптимизация хроматографического процесса достигается только лишь подбором температурного режима: градиентного или же изократического. Последний наиболее предпочтителен для рутинного анализа, т.к. не требует дополнительного времени на возвращение в исходное состояние.

Изучение параметров удерживания ГС провели в изотермическом режиме хроматографирования: подвижная фаза – гелий, объемная скорость 1 мл/мин; неподвижная фаза: а) HP-1MS - 100%-метил-полисилоксановая фаза 0,25 мкм; б)

HP-5MS - 5%-фенил-95%-метил-полисилоксановая фаза 0,25 мкм; в) HP-INNOWAX – полиэтиленгликоль 1 мкм (таблица 10; рисунок 12).

Таблица 10 – Хроматографические параметры ГС на капиллярных колонках с различными неподвижными фазами при различном значении температуры термостата колонок ($n=3$).

Температура термостата, °C	Время удерживания (t_R), мин		
	HP-INNOWAX	HP-1ms	HP-5ms
30	1,251±0,002	2,183±0,004	1,871±0,003
35	1,249±0,003	2,109±0,003	1,799±0,002
40	1,248±0,002	2,073±0,003	1,762±0,003
45	1,247±0,002	1,977±0,003	1,655±0,002
50	1,241±0,002	1,952±0,002	1,617±0,002

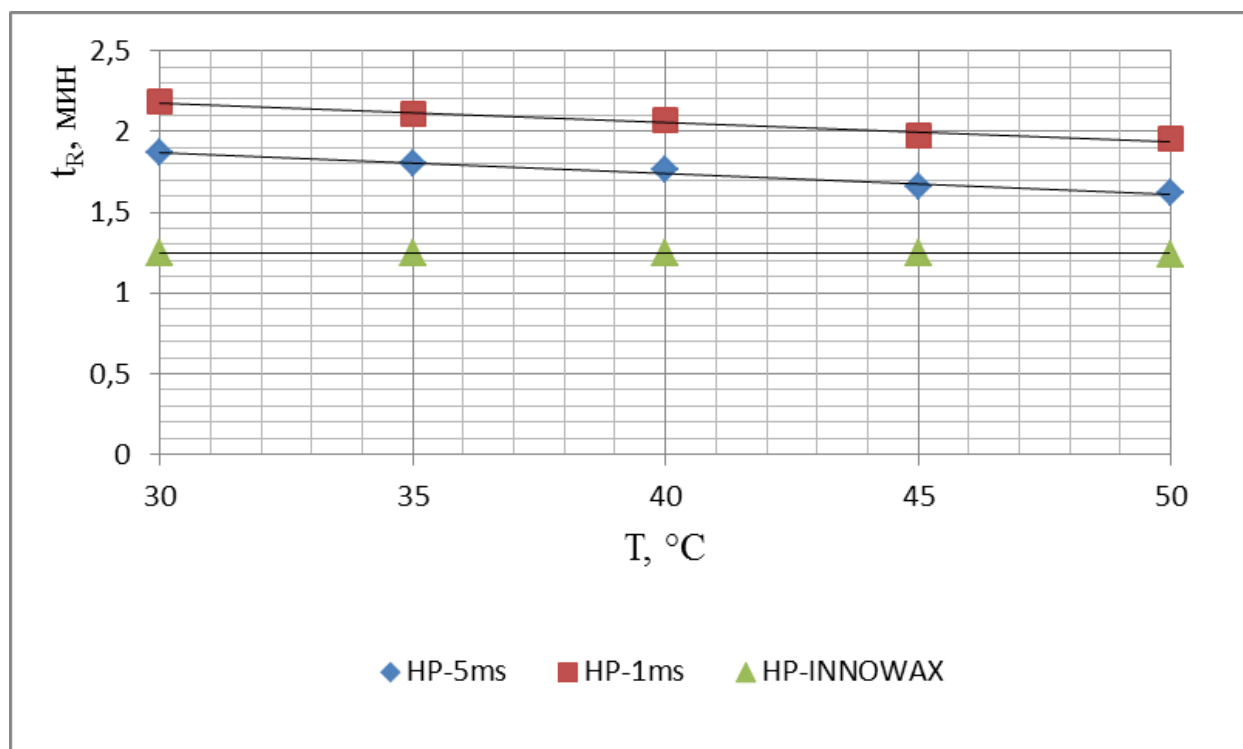


Рисунок 12 – Зависимость времени удерживания ГС от температуры колонки на различных неподвижных фазах

В эксперименте показано незначительное удерживание ГС на капиллярных колонках с нанесенной неполярной фазой (НР-1ms, НР-5ms) при температуре выше комнатной, также отсутствие сорбции на сильнополярной колонке НР-INNOWAX. Пяти процентное содержание в составе неподвижной фазы фенилполисилоксана (НР-5ms) уменьшает сорбционные свойства колонки по отношению к ГС. Также, можно отметить значительное уменьшение времени удерживания ГС при увеличении температуры термостата колонки до 50 °С., что может свидетельствовать о выходе пика ГС с мертвым объемом. Поэтому рабочими условиями хроматографирования ГС принята температура термостата колонок 40 °С, обеспечивающая минимальное время анализа при сохранении удерживания ГС. Как отмечается производителем, колонки НР-5ms обладают меньшей стабильностью по сравнению с НР-1ms, поэтому предложено в дальнейшей работе использовать именно последние. Хроматограмма в приведенных условиях приведена на рисунке 13.

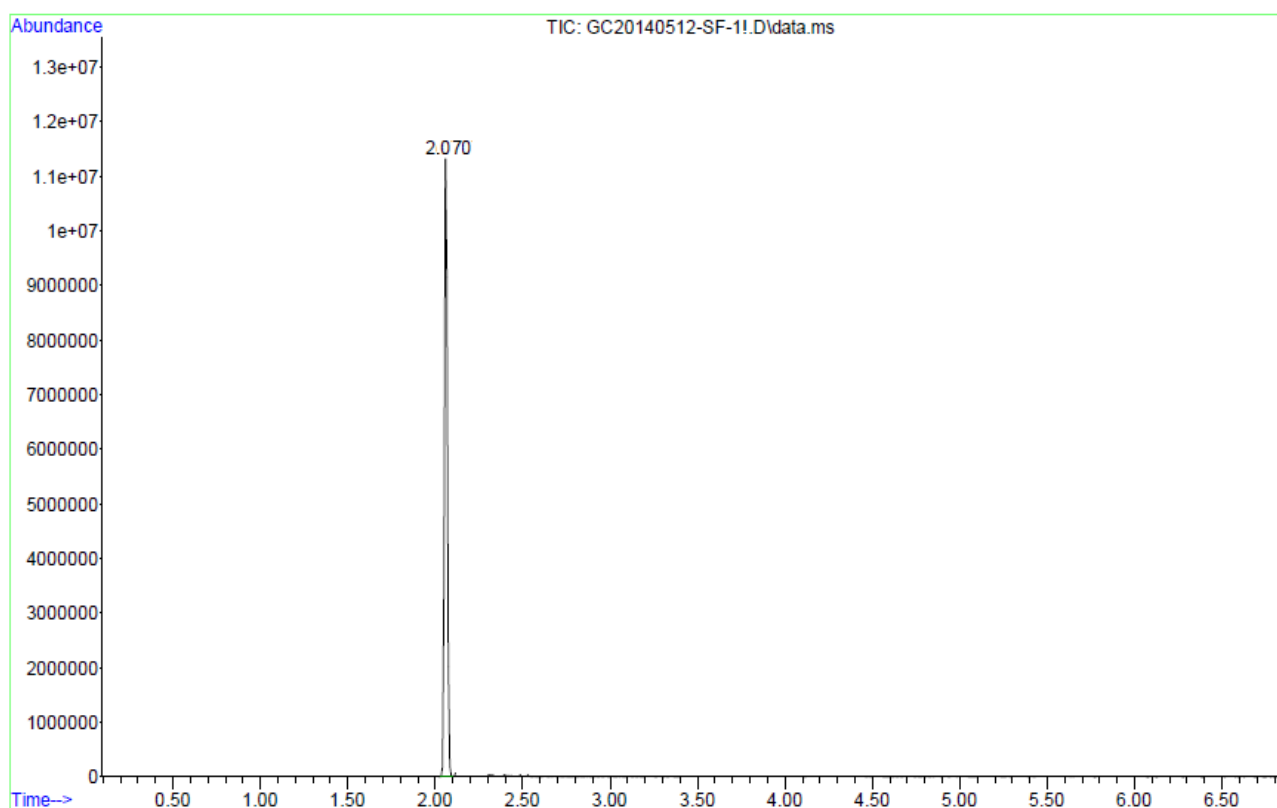


Рисунок 13 – Хроматограмма ГС в рабочих условиях

Таким образом, нами были подобраны рабочие условия газохроматографического определения гексафторида серы – изотерма 40 °С на колонке HP-1MS.

3.1.2. Влияние температуры источника ионов масс-детектора на аналитический сигнал гексафторида серы.

Из простоты строения молекулы в спектре электронной ионизации ГС присутствует фрагментация по типу $[M-nF]^+$. Как известно, помимо энергии электронов на интенсивность фрагментации влияет и температура источника ионов, однако, в связи с аппаратными особенностями, аналитики имеют возможность варьировать только последний параметр. Литературные данные свидетельствуют о преимущественном содержании в масс-спектре иона 127 m/z, соответствующего фрагменту $[SF_5]^+$ [88].

Для определения ГС в крови был выбран режим селективного ионного мониторинга, который, как следует из литературных источников [54, 81, 91], имеет преимущество перед режимом полного ионного тока (SCAN) заключающееся в снижении предела обнаружения галогенсодержащих аналитов в 2-20 раз, что является определяющим фактором при анализе микроколичеств вещества.

Изучение влияния температуры источника ионов (ИИ) на интенсивность сигнала ГС в режимах SCAN и SIM по иону 127 m/z показало (рисунки 14 и 15), что увеличение температуры ИИ со 100 до 200 °С, приводит к увеличению общего тока (примерно на 4,5 %), однако, интенсивность иона 127 m/z снижается на 13 %. Причем, дальнейшее увеличение (до 250 °С) температуры ИИ приводит к еще большей фрагментации иона $[SF_5]^+$ (рисунок 5), и, как следствие, снижению интенсивности сигнала ГС в режиме селективного ионного мониторинга.

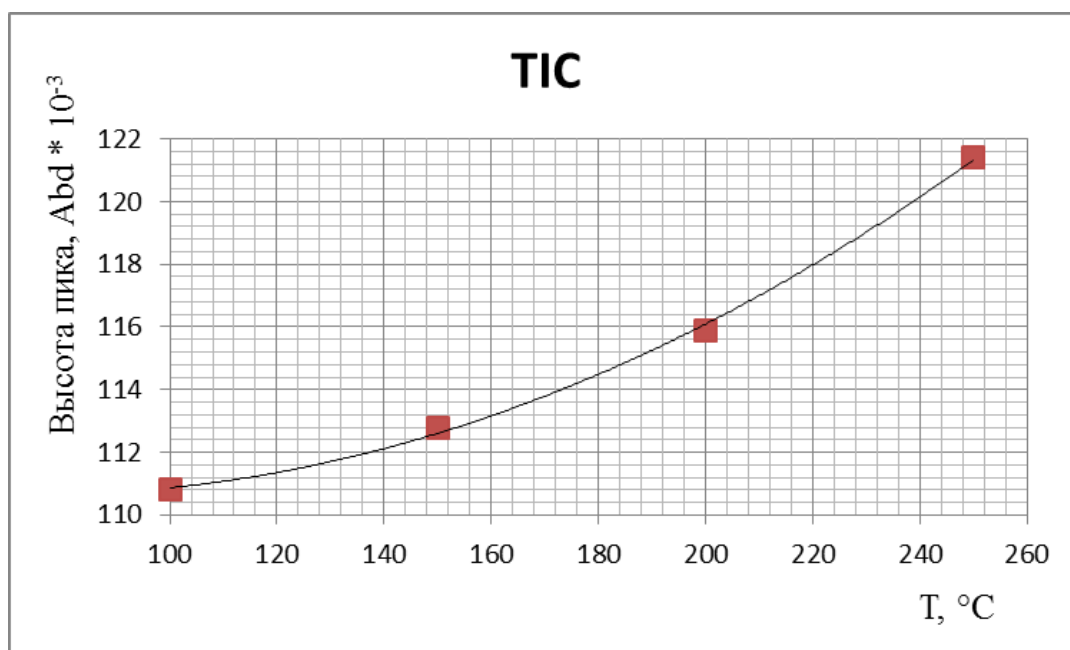


Рисунок 14 – Зависимость интенсивности сигнала ГС в режиме SCAN от температуры источника ионов ($c(\text{SF}_6) = 1 \text{ мкмоль/дм}^3$).

Как следствие из этого, предел обнаружения и предел количественного определения в режиме SIM увеличиваются при росте температуры источника ионов, что является негативным фактором для аналитиков.

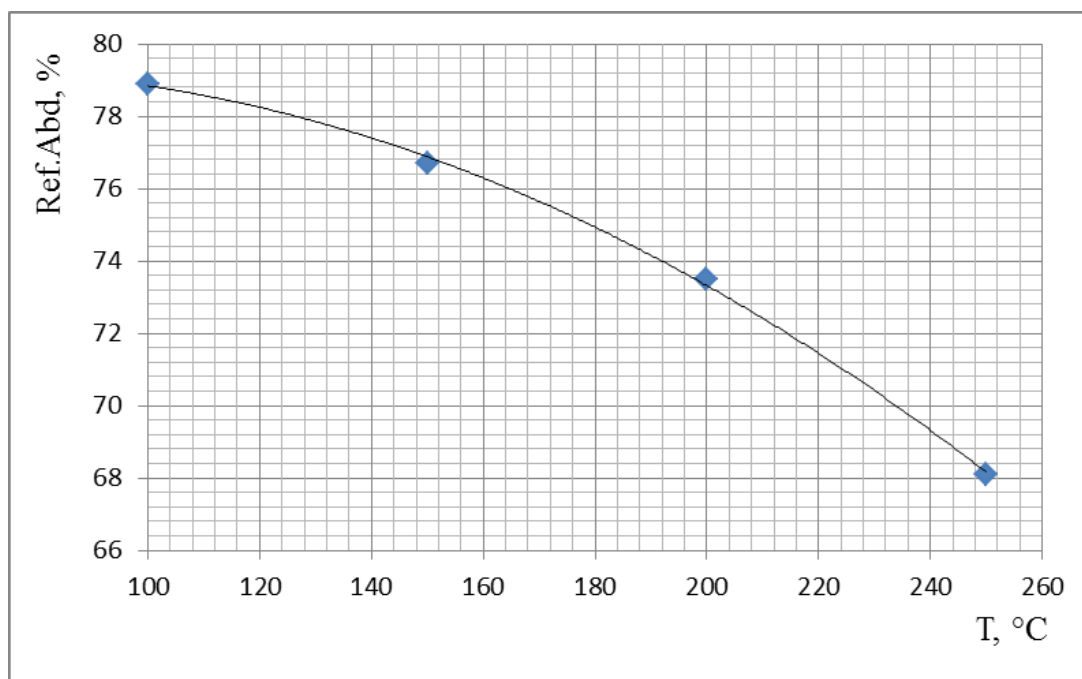


Рисунок 15 – Зависимость относительной интенсивности иона 127 m/z от температуры источника ионов

При температуре источника ионов 100 °С масс-спектр ГС (рисунок 16) более чем на 78 % состоит из сигнала иона $[\text{SF}_5]^+$ с 127 m/z.

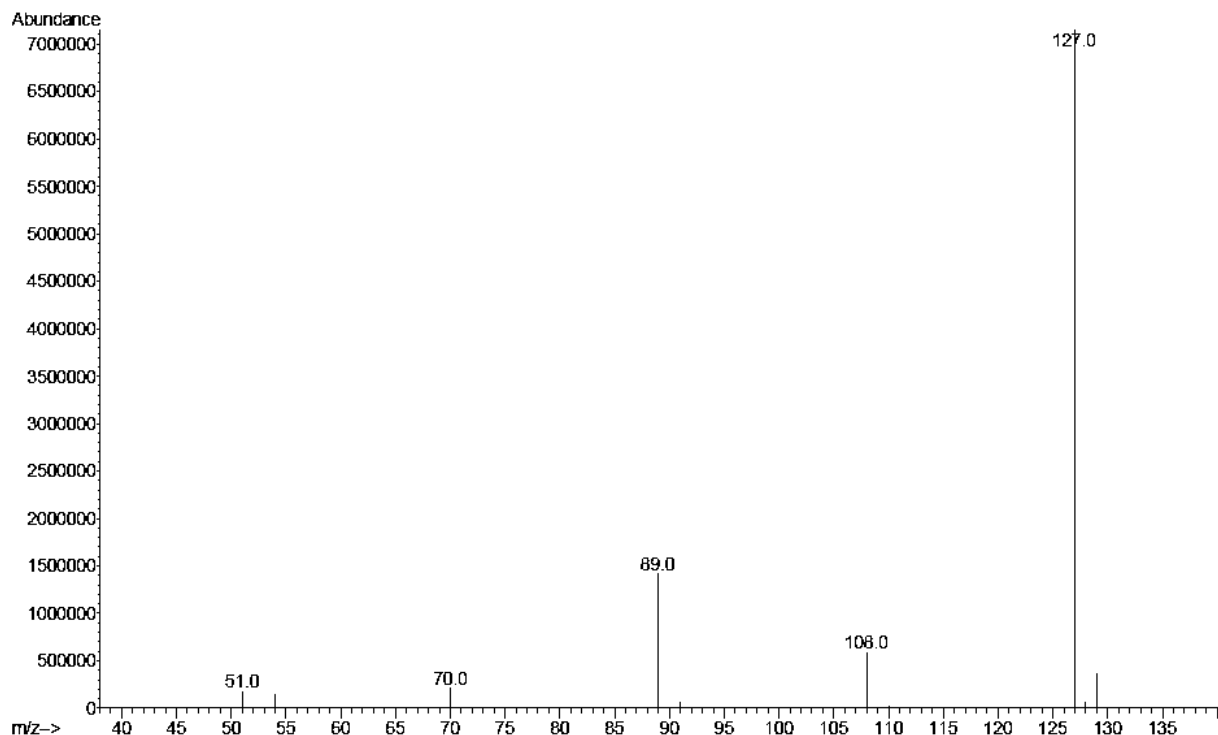


Рисунок 16 – Масс-спектр гексафторида серы при температуре источника ионов 100 °С

Таким образом, нами экспериментально отработаны условия масс-спектрометрического детектирования ГС, обеспечивающее наибольшую чувствительность – температура источника ионов 100 °С, режим селективного ионного мониторинга по иону 127 m/z.

3.2. Выбор внутреннего стандарта

Как отмечалось в литературном обзоре, выбор внутреннего стандарта для определения ГС не тривиальная задача. Основными требованиями, предъявляемыми к внутренним стандартам, являются [25, 28]:

- хорошо разрешенный пик, расположенный на хроматограмме рядом с пиками определяемых компонентов;
- летучесть, близкая определяемым компонентам;
- отсутствие в анализируемой смеси;
- хорошая растворимость в анализируемой смеси
- инертность по отношению к другим компонентам пробы;
- содержание после добавки в количестве, соизмеримом с анализируемыми компонентами.

В связи со структурными особенностями молекулы аналита подобрать внутренний стандарт (ВС) из гомологического ряда, либо изотопно-меченный, удовлетворяющий всем требованиям, затруднительно. Примененный нами [17], при использовании ДЭЗ, тетрахлорметан (как и другие галогенсодержащие вещества), показал свою непригодность при масс-спектрометрическом детектировании: большая ширина пика и низкий отклик детектора не позволяют проводить правильное интегрирование сигнала внутреннего стандарта (рисунок 17).

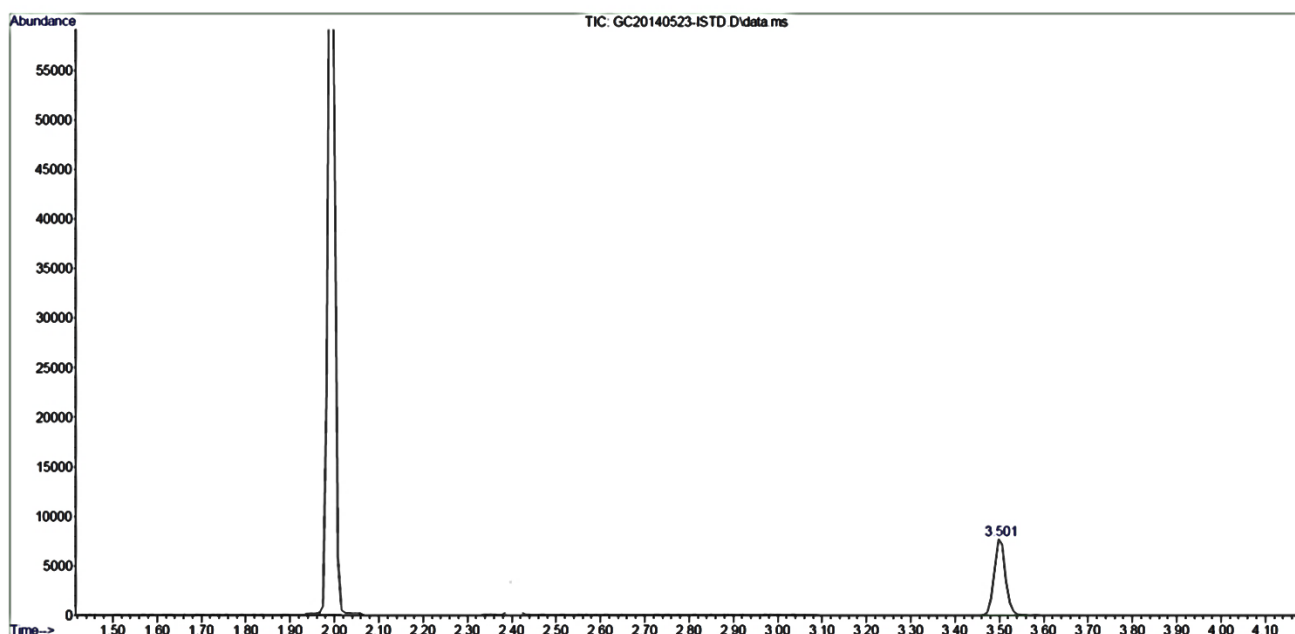


Рисунок 17 – Хроматограмма образца ГС с добавкой CCl_4 (5 мкмоль/дм³)

Поэтому, из числа органических веществ, СТХ которых производятся в России, что делает их коммерчески доступными для использования в большинстве лабораторий, в качестве ВС нами был выбран толуол (в концентрации 5 мкмоль/дм³). Данное вещество, наряду с другими, имеет ряд преимуществ: меньшее время удерживания в условиях проведения анализа (по сравнению с другими СТХ); высокая чувствительность МС детектора и низкая растворимость в воде (таблица 11).

Таблица 11 – Параметры предполагаемых внутренних стандартов.

№	Внутренний стандарт	$T_{\text{кип}}, ^\circ\text{C}$	S
1	бензол	80,1	0,073
2	м-ксилол	139,1	-
3	о-ксилол	144,4	0,020
4	толуол	110,6	0,014
5	этилбензол	136	0,015

Примечание: S – растворимость в 100 мл воды.

Как видно из приведенных данных, наилучшими параметрами внутреннего стандарта обладает толуол ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$).

Для предотвращения перегрузки масс-детектора при выходе из колонки растворителя установлено временное окно 3,0 – 5,0 минуты, в которые филамент детектора отключен. Репрезентативная хроматограмма модельного раствора в рабочих условиях представлена на рисунке 18.

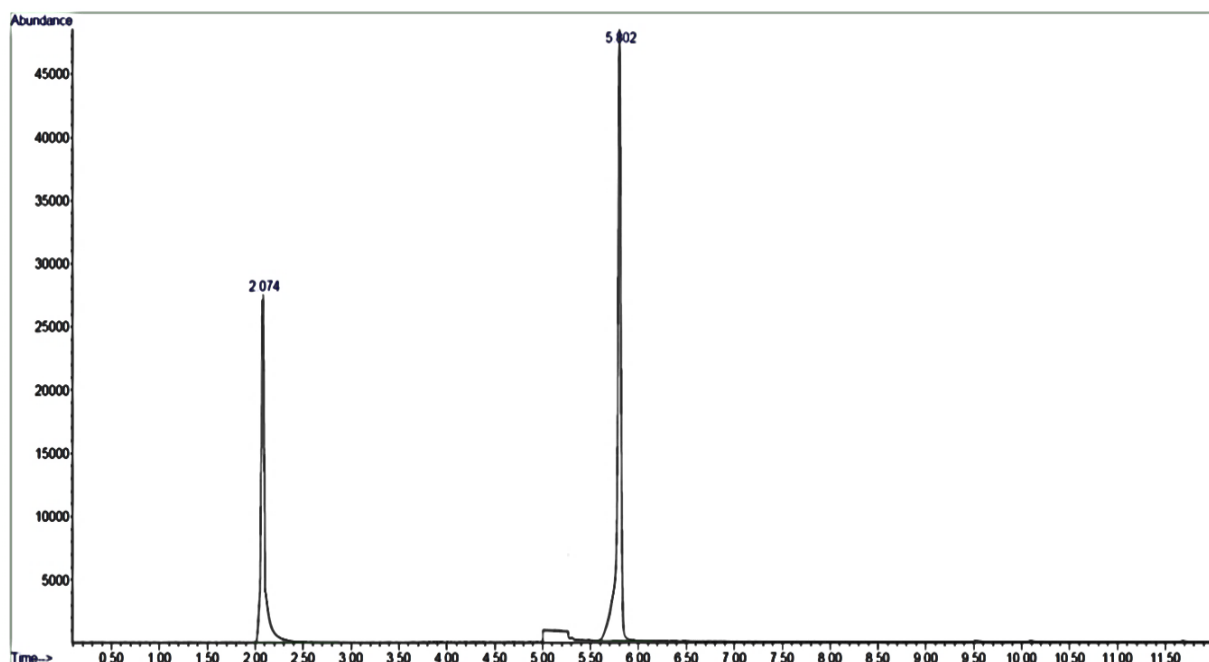


Рисунок 18 – Хроматограмма образца ГС ($0,15 \text{ мкмоль/дм}^3$) с добавкой толуола (5 мкмоль/дм^3)

Таким образом, были разработаны условия газохроматографического определения гексафторида серы с использованием внутреннего стандарта - толуола, обеспечивающие возможность проведения анализа крови.

3.3. Подбор рабочих условий экстракции гексафторида серы из образцов крови.

Как уже отмечалось, прямое определение ГС в крови невозможно в силу сложности матрицы объекта анализа, а предполагаемый экстракционный способ (жидкость-жидкостная экстракция) определения аналита в крови не был изучен ранее. Выбор экстрагента основывается на общепринятых требованиях – низкая растворимость в воде, хорошая растворимость ГС в растворителе и относительно низкая летучесть ($T_{\text{кип.}} > 60^{\circ}\text{C}$) [16]. Наиболее подходящими на роль экстрагента являются циклогексан ($T_{\text{кип.}} = 80,74^{\circ}\text{C}$; 5,5 мг/100 мл) и гептан ($T_{\text{кип.}} = 98,42^{\circ}\text{C}$; 0,3 мг/ 100 мл).

Опытные образцы крови с добавкой ГС ($1,0 \text{ мкмоль/дм}^3$) подготовлены по схеме, приведенной в главе 2 экстрагировали равным объемом растворителя. В качестве метода сравнения использовали подход с термической экстракцией ГС. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Характеристика степени извлечения ГС из образцов крови экстракционным и термическим способами ($n = 6$, $p = 0,95$).

Способ извлечения ГС	Введено, мкмоль/дм^3	Найдено, мкмоль/дм^3	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %
Циклогексан	1,0	$0,61 \pm 0,06$	61	9,4
Гептан		$0,59 \pm 0,03$	59	5,5
Термический 100°C		$0,68 \pm 0,04$	68	5,6
Термический 300°C		$0,96 \pm 0,05$	96	4,9

Примечание: $\text{KB} = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$

Как показывает эксперимент, экстракционный способ извлечения аналита, аналогичный, описанному в предыдущих работах [19,20], из образца в 1,6 раза менее эффективен по сравнению с термическим, т.е. влияние матричного эффекта

велико, однако трудозатраты термического способа извлечения не позволяют предложить его в качестве рабочего метода пробоподготовки при потоковых анализах.

Значительное увеличение коэффициента вариации при экстракции циклогексаном можно объяснить его большей летучестью, по сравнению с гептаном, и как следствие изменением концентраций аналита и ВС. Поэтому в дальнейшей работе по оптимизации использовался метод жидкость-жидкостной экстракции гексафторида серы гептаном.

Для нивелирования матричного эффекта при экстракции ГС гептаном было изучено влияние высаливающих и денатурирующих агентов, в качестве которых использовали NaCl (1 моль/дм³), трихлоруксусную кислоту (30 %) и Al₂(SO₄)₃ (1 моль/дм³) (таблица 13).

Таблица 13 – Влияние высаливающих агентов на степень извлечения ГС из образцов крови (n = 6, p = 0,95).

	Введено, мкмоль/дм ³	Найдено, мкмоль/дм ³	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %
Гептан	1,0	0,59±0,03	59	5,0
Гептан+NaCl		0,61±0,03	54	5,3
Гептан+NaCl+ТХУ		0,63±0,03	57	5,0
Гептан+ТХУ		0,55±0,03	55	5,2
Гептан+ТХУ+Al ₂ (SO ₄) ₃		0,78±0,04	78	4,9
Гептан+Al ₂ (SO ₄) ₃		0,81±0,04	81	4,7

Незначительное влияние ТХУ и хлорида натрия, которые увеличивают извлекаемое количество ГС не более чем на 10 % (при совместном применении) может свидетельствовать о том, что ГС связан не с белками крови, а находится с гидрофобными молекулами, возможно, в виде мицелл. Что косвенно подтверждается значительным увеличением степени извлечения ГС из образцов

крови под действием сульфата алюминия, которое можно объяснить его коагулирующим действием, и, большим влиянием на разрушение мицелл, заключающих в себе ГС.

Дальнейшим этапом работы являлось изучение интенсификации процесса экстракции ГС из образцов крови гептаном по средствам использования лабораторного смесителя типа «вортекс». Результаты эксперимента проведены в таблице 14.

Таблица 14 – Влияние времени вортексирования на степень извлечения ГС из образцов крови (n=6, p= 0.95)

Объем гептана, мл	Введено, мкмоль/дм ³	Объем пробы, мл	Длительность вортексирования, сек	Найдено, мкмоль/дм ³	Степень извлечения, %
0,5	1,0	0,5	0	0,59±0,03	59
			10	0,75±0,04	75
			20	0,88±0,05	88
			30	0,85±0,04	85

Показано, что время вортексирования (в исследуемых значениях) является важным параметром пробоподготовки, т.к. десятисекундное вортексирование приводит к увеличению степени извлечения более чем на 20 %, по сравнению с обычным перемешиванием. И при увеличении времени воздействия до 20 секунд достигается максимальная степень извлечения гексафторида серы из образца крови, которая превышает эффект сульфата алюминия (таблица 4). Таким образом, рабочими условиями вортексирования при пробоподготовке являются – максимальная скорость (2000 об./мин) и время 20 секунд, которые обеспечивают простоту и экспрессность анализа без использования дополнительных реагентов.

Далее были определены рабочие условия извлечения, а именно соотношение «объем пробы : гептан» (таблица 15).

Таблица 15 – Влияние соотношения «гептан : образец крови» на степень извлечения ГС из образцов крови (n=6, p= 0,95)

Объем пробы, мл	Объем гептана, мл	Введено, мкмоль/дм ³	Длительность вортирования, сек	Найдено, мкмоль/дм ³	Степень извлечения, %
0,5	0,5	1,0	20	0,88±0,05	88
	1,0			0,99±0,05	99
1,0	0,5			0,72±0,04	72
	1,0			0,87±0,05	87

Из проведенного эксперимента следует, что степень извлечение ГС из образца крови увеличивается при увеличении соотношения «гептан : образец крови» и достигает 99 % при соотношении 2:1.

Таким образом, нами были подобраны рабочие условия извлечения ГС из образцов крови, обеспечивающее степень извлечения 99 %:

- извлечение гептаном с применением лабораторного смесителя типа «вортекс»;
- время вортирования – 20 секунд;
- соотношение «кровь : гептан» - 1:2.

3.4. Стабильность биологических и градуировочных образцов гексафторида серы

При разработке методики критичным является время стабильности исследуемых растворов. Для установления сроков пригодности использования биологических и градуировочных растворов была определена стабильность сигнала гексафторида серы в соответствующих условиях.

3.4.1. Стабильность градуировочных растворов гексафторида серы

Для оценки стабильности градуировочных растворов (в диапазоне 0,1 – 15 мкмоль/дм³) после приготовления в условиях автосемплера, из каждого раствора отбирали пробы через 1, 2, 4, 6, 8 и 10 часов и определяли величину сигнала ГС ($\frac{S(SF_6)}{S(C_6H_5CH_3)}$) (таблица 16).

Таблица 16 – Результаты изучения стабильности градуировочных растворов ГС (n=6, p=0,95)

		$\frac{S(SF_6)}{S(C_6H_5CH_3)}$						
t, ч		0	1	2	4	6	8	10
Концентрация ГС, мкмоль/дм ³	0,5	0,361±0,018	0,350±0,017	0,359±0,017	0,351±0,019	0,346±0,020	0,349±0,020	0,355±0,021
	1	0,75±0,03	0,75±0,04	0,72±0,04	0,74±0,04	0,76±0,04	0,74±0,04	0,73±0,04
	5	3,91±0,18	3,96±0,17	3,90±0,19	3,84±0,18	3,90±0,18	3,79±0,20	3,88±0,19
	10	7,9±0,4	7,7±0,4	7,9±0,4	7,9±0,4	8,2±0,4	7,7±0,4	7,6±0,4
	15	11,8±0,6	11,4±0,6	11,5±0,6	11,9±0,6	11,7±0,6	12,1±0,6	11,7±0,6

Анализ показал, что, несмотря на стабильность насыщенного раствора ГС в течение лишь 30 минут приготовленные на его основе градуировочные растворы (в диапазоне концентраций 0,5 – 15 мкмоль/дм³) в условиях автосемплера хроматографа сохраняют стабильность на протяжении 10 часов.

3.4.2. Кратковременная стабильность образцов крови

Для определения срока, в течение которого образцы крови можно хранить в условиях лаборатории до анализа, проводили изучение стабильности образцов с содержанием гексафторида серы на двух уровнях концентраций.

Кратковременная стабильность образцов крови была изучена при их хранении в течение 24 часов при комнатной температуре, $+2-8^{\circ}\text{C}$ и при -40°C в плотно закрытых пробоотборниках. Для исследования брали 2 уровня концентраций ГС: $0,1 \text{ мкмоль/дм}^3$ и $1,0 \text{ мкмоль/дм}^3$. Результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты исследования кратковременной стабильности образцов крови ($n=6$, $p=0,95$)

Условия хранения образцов	Значение найденной концентрации ГС, мкмоль/дм^3			
	4 ч	8 ч	12 ч	24 ч
Уровень концентрации	$0,1 \text{ мкмоль/дм}^3$			
Комнатная температура	$0,095 \pm 0,007$	$0,089 \pm 0,006$	$0,081 \pm 0,006$	$0,072 \pm 0,005$
Холодильник $+2 - +8^{\circ}\text{C}$	$0,097 \pm 0,006$	$0,092 \pm 0,006$	$0,088 \pm 0,005$	$0,081 \pm 0,006$
Морозильная камера -40°C	$0,096 \pm 0,007$	$0,094 \pm 0,006$	$0,095 \pm 0,006$	$0,095 \pm 0,005$
Уровень концентрации	$1,0 \text{ мкмоль/дм}^3$			
Комнатная температура	$0,97 \pm 0,05$	$0,93 \pm 0,04$	$0,89 \pm 0,04$	$0,79 \pm 0,04$
Холодильник $+2-8^{\circ}\text{C}$	$0,98 \pm 0,05$	$0,93 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,04$	$0,85 \pm 0,04$
Морозильная камера -40°C	$0,96 \pm 0,05$	$0,95 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,04$	$0,97 \pm 0,04$

Стабильность оценивали по степени деградации, которая для образца с концентрацией $0,1 \text{ мкмоль/дм}^3$ при комнатной температуре и в условиях холодильника составила 28 и 19 %, соответственно. Для 2 уровня концентрации ($1,0 \text{ мкмоль/дм}^3$) содержание ГС снизилось в течение 24 часов в условиях комнатной температуры и холодильника на 21 и 15 %, соответственно. При этом достоверного снижения содержания ГС при хранении в морозильной камере не отмечалось на обоих уровнях концентрации.

Поэтому принято осуществлять хранение образцов крови до анализа при комнатной температуре не более 8 часов, при температуре $+2 - +8^{\circ}\text{C}$ – не более 12 часов.

3.4.3. Долговременная стабильность образцов крови

Для исследования долговременной стабильности образцы крови с концентрациями 0,1 и 1,0 мкмоль/дм³, оставляли на хранение при –40 °С в течение 14 суток для последующего анализа. Оба образца анализировали перед замораживанием и после оттаивания в 6 параллельных измерениях, и рассчитывали среднее значение (таблица 18).

Таблица 18 – Результатов исследования долговременной стабильности (n = 6, p = 0,95) при –20 °С

Номер образца	1	2
X _н , мкмоль/дм ³	0,1	1,0
X _{ср} , мкмоль/дм ³ (до замораживания)	0,103±0,006	1,06±0,05
X _{ср} , мкмоль/дм ³ (после оттаивания)	0,093±0,005	0,97±0,04
Убыль, %	9,57	8,70

Таким образом, было показано, что за 14 суток хранения в морозильной камере (- 40 °С) образцы крови теряют до 10 % введенного ГС. Поэтому при изучении фармакокинетики лекарственных средств на основе ГС экспериментальные образцы крови могут храниться при –40 °С до проведения анализа.

3.5. Разработка алгоритма газохроматографической методики определения гексафторида серы в крови

3.5.1. Оценка мешающего влияния органической матрицы

Не маловажным является установление мешающих факторов матрицы анализируемого объекта. Как было предположено ранее (п.3.3), ГС не связывается с белками крови. Для подтверждения были подготовлены различные образцы крови двух видов животных, содержащие добавки компонентов крови: 1, 2, 3 % человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), 5 % гемоглобина, 10 % форменных элементов крови (ФЭК) и 5 % холестерина. В образцы было введено известное количество лекарственного средства на основе ГС перед анализом по разработанной методике, результаты приведены в таблицах 19 и 20.

Таблица 19 – Определение ГС в образцах крови крыс с добавками ее компонентов (n = 6; p = 0,95)

Введено ГС, мкмоль/дм ³	Добавленный компонент крови	Найдено ($C \pm \epsilon$), мкмоль/дм ³
1,0	1 % ЧСА	0,94±0,07
	2 % ЧСА	0,95±0,06
	3 % ЧСА	1,03±0,05
	гемоглобин	1,04±0,05
	ФЭК	0,93±0,06
	холестерин	0,96±0,06
	-	1,03±0,05

Таблица 20 – Определение ГС в образцах крови кроликов с добавками ее компонентов ($n = 6$ $p = 0,95$)

Введено ГС, мкмоль/дм ³	Добавленный компонент крови	Найдено ($C \pm \epsilon$), мкмоль/дм ³
1,0	1 % ЧСА	0,98±0,05
	2 % ЧСА	1,05±0,06
	3 % ЧСА	0,96±0,05
	гемоглобин	0,97±0,05
	ФЭК	1,03±0,05
	холестерин	0,96±0,06
	-	1,01±0,04

Результаты определения ГС в образцах с добавкой компонентов крови свидетельствуют об отсутствии мешающего влияния матрицы при количественном определении гексафторида серы, что делает возможным применение разработанной методики для анализа крови, полученной от различных видов животных и пациентов.

3.5.2. Алгоритм пробоподготовки образцов крови

В результате проведенных исследований нами было предложено проводить определение гексафторида серы в образцах крови по следующей методике:

Подготовка пробы крови.

Аликвоту 1 мл крови помещают в стеклянную пробирку, добавляют 2 мл раствора внутреннего стандарта (5 мкмоль/дм³) в гептане и помещают в лабораторный смеситель типа «вортекс», процесс ведут при максимальной скорости в течение 20 секунд. Далее раствор центрифугируют при 10000 об/мин в течение 5 минут, гептановый слой помещают в вialу автосемплера, герметично закрывают.

Условия определения.

Газовый хроматограф Agilent 7860 с масс-селективным квадрупольным детектором Agilent 5975 (Agilent Technologies, США), оснащенный капиллярной колонкой HP-1MS ($30\text{ м} \times 0,25\text{ мм} \times 0,25\text{ мкм}$)

Температурный режим элюирования: изократический 1-12 мин ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Режим детектирования: селективный ионный мониторинг (SIM) 127 m/z (1-3 мин); OFF (3-5 минуты); SIM 92 m/z (5-7 мин). Температура источника ионов $100\text{ }^{\circ}\text{C}$; температура квадрупольного полюса $150\text{ }^{\circ}\text{C}$; энергия ионизации 70 эВ .

Объем вводимой пробы 1 мкл , без деления потока.

Приготовление раствора внутреннего стандарта (5 мкмоль/дм^3).

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 45 мг толуола и доводят объем раствора до метки гептаном (раствор А). Далее 1 см^3 раствора А помещают в мерную колбу на 100 см^3 и доводят объем раствора до метки гептаном (раствор Б). Далее 1 см^3 раствора Б помещают в мерную колбу на 100 см^3 и доводят объем раствора до метки гептаном (раствор толуола с концентрацией 5 мкмоль/дм^3).

Приготовление насыщенного раствора гексафторида серы.

В мерный цилиндр вместимостью 250 см^3 наливают 150 см^3 гептана ($t^0 = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), погружают в него стеклянную трубку, присоединенную к баллону с гексафторидом серы, открывают кран баллона и барботируют в течение 3 минут со скоростью $20\text{ дм}^3/\text{минуту}$. Срок использования насыщенного раствора – 30 минут.

В мерную колбу, вместимостью 10 см^3 помещают $0,5\text{ см}^3$ насыщенного раствора и доводят объем колбы до метки гептаном (C_0).

Затем $0,154 \text{ см}^3$ раствора C_0 с помощью дозатора помещают в мерную колбу вместимостью 10 см^3 и доводят объем колбы до метки гептаном, концентрация гексафторида серы 55 мкмоль/дм^3 (градуировочный раствор).

Рабочие градуировочные растворы гексафторида серы готовят путем разведения градуировочного раствора гексафторида серы (55 мкмоль/дм^3), приготовленный по п. 10.2.6 и раствора внутреннего стандарта (500 мкмоль/дм^3), приготовленный по п. 10.2.2, как указано в таблице 21.

Таблица 21 – Приготовление рабочих градуировочных растворов.

Маркировка рабочего градуировочно го раствора	Концентрация гексафторида серы, мкмоль/дм^3	V градуировоч ного раствора гексафтори да серы, см^3	V раствора внутреннего стандарта (500 мкмоль/дм^3)Б, см^3	V колбы, см^3
ГР 1	15	2,732	0,1	10
ГР 2	10	1,821	0,1	10
ГР 3	3	0,546	0,1	10
ГР 4	1,5	0,273	0,1	10
ГР 5	0,3	0,546	1	100
ГР 6	0,15	0,273	1	100
ГР 7	0,12	0,219	1	100
ГР 8	0,09	0,164	1	100
ГР 9	0,06	0,109	1	100

Вносят 1 см^3 рабочего градуировочного раствора с помощью дозатора в хроматографическую вialу вместимостью 2 см^3 , вialу плотно закрывают крышкой с тефлоновой прокладкой.

Срок хранения растворов 10 часов при температуре $(20 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

Таким образом, нами предложен алгоритм проведения анализа образцов крови для количественного определения гексафторида серы (рисунок 19).



Рисунок 19 – Схема анализа образцов крови для определения ГС методом ГХ-МС

Предложенный алгоритм пробоподготовки образцов нивелирует матричные эффекты крови, является экспрессным, не трудозатратным и позволяет добиться степени извлечения гексафторида серы 99 %.

3.6. Проверка правильности методики определения гексафторида серы

Для проверки правильности методики определения ГС подготовлены образцы крови, в которые была произведена известная добавка лекарственного средства на основе ГС. Полученные модельные образцы крови были подготовлены по предложенному алгоритму и проанализированы с помощью разработанной методики, результаты представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Результаты определения ГС в образцах крови методом ГХ-МС (n=3)

В пробе	Введено, мкмоль/дм ³	Найдено (C±ε), мкмоль/дм ³	RSD(%)
Менее ПКО	10,0	10,1±0,4	4
	5,0	4,92±0,27	6
	1,0	0,95±0,06	6
	0,10	0,109±0,010	9

Полученные результаты определения ГС в широком диапазоне концентраций (10 – 0,1 мкмоль/дм³) определяются с погрешностью 3,96 – 9,17 %. Таким образом, показана правильность разработанной методики определения гексафторида серы в исследуемом диапазоне.

Выводы по главе 3

В результате проведенного исследования по определению хроматографического поведения гексафторида серы на капиллярных колонках и по установлению влияния температуры источника МСД на аналитический сигнал были выбраны рабочие условия газохроматографического определения ГС.

Разработана методика пробоподготовки образцов крови для извлечения ГС из матрицы, обеспечивающая степень извлечения аналита до 99 %.

В ходе изучения стабильности образцов крови показано влияние температуры хранения на их деградацию. Определено максимальное время хранения в условиях лаборатории: при комнатной температуре – 8 часов, при +2 - +8 °С – 12 часов.; при -40 °С – 14 суток.

Проведена оценка правильности методики и мешающего влияния органической матрицы на результаты определения ГС.

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В КРОВИ МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Для внедрения методики в клиническую практику, с учетом ожидаемого широкого диапазона концентраций ГС в крови, требуется установить метрологические характеристики методики измерения, с целью обеспечения необходимой точности измерения во всем диапазоне определяемых концентраций.

Оценку метрологических характеристик методики определяли по следующим параметрам:

- диапазон линейности – диапазон концентраций ГС, в котором наблюдается линейная зависимость величины сигнала $\frac{S(SF_6)}{S(C_6H_5CH_3)}$ от концентрации аналита;
- прецизионность (повторяемость, внутрилабораторная прецизионность) – степень близости полученных независимых результатов определения ГС в виде среднеквадратичного отклонения (СКО)
- правильность, с целью определения вероятности возникновения систематическое погрешности;
- точность, которая сочетает случайную и систематическую составляющие погрешности.

4.1. Оценка предела обнаружения и предела количественного определения

Возможность аналитической методики в рабочих условиях для не больших уровней концентрации определяемого компонента характеризуются пределом количественного определения (C_{lim}) и пределом обнаружения ($C_{min,p}$), которые демонстрируют реальные возможности методики КХА. $C_{min,p}$ – наименьшая концентрация аналита, при которой можно статистически значимо обнаружить определяемое вещество в анализируемой пробе при рабочих условиях методики. C_{lim} – минимальная концентрация, которую можно определить с заданным относительным стандартным отклонением [24] или погрешностью, не превосходящую заданную [3]. Несмотря на значительное число способов расчета предела обнаружения [6,7,9-11,32,33,76], для объективного сравнения возможностей одного метода с другим, рекомендуют [34] использовать оценку предела обнаружения, учитывающую воспроизводимость результатов. Например, широко используемый в хроматографических методиках подход определения $C_{min,p}$ (по отношению «сигнал/шум») ограничен использованием одной приборной базы, и как следствие, полученные в разных лабораториях значения $C_{min,p}$ будут отличаться, т.к. в большей мере установленная таким способом $C_{min,p}$ является пределом детектирования прибора, нежели пределом обнаружения методики.

Как уже отмечалось ранее, наибольшей информативностью обладают предел обнаружения и предел количественного определения, рассчитанные с помощью статистических методов. Поэтому для оценки предела обнаружения ($C_{min,p}$) был использован подход, основанный на определении стандартного отклонения сигнала вблизи ПО по трехсигмовому критерию Кайзера [33]. Значения $C_{min,p}$, определенные по этому критерию вблизи нижней границы диапазона линейности, приведены в таблице 23.

Таблица 23 – Результаты расчета предела обнаружения ($C_{\min,p}$) ГС в экспериментальных образцах крови

Введенная концентрация ГС (C_0), мкмоль/дм ³	Найденная концентрация ГС (C_i), мкмоль/дм ³	Средняя $\bar{C}$, мкмоль/дм ³	$ C_i - \bar{C} $	σ	$C_{\min,p}$, мкмоль/дм ³
0,060	0,069	0,065	0,004	0,008	0,025
	0,078		0,013		
	0,054		0,011		
	0,068		0,003		
	0,061		0,004		
	0,062		0,003		
0,090	0,091	0,099	0,008	0,010	0,029
	0,109		0,010		
	0,1		0,001		
	0,093		0,006		
	0,113		0,014		
	0,091		0,008		
0,120	0,121	0,129	0,008	0,012	0,037
	0,137		0,008		
	0,125		0,004		
	0,133		0,004		
	0,147		0,018		
	0,112		0,017		

Определен предел обнаружения гексафторида серы $C_{\min,p} = 0,025$ мкмоль/дм³. Для расчета предела количественного определения нами использован подход [33] по уравнению предложено:

$$C_{\text{lim}} = k \times C_{\text{min,p}} \text{ (где } k = 2 - 3),$$

после проведения расчета установлено $C_{\text{lim}} = 0,05 \text{ мкмоль/дм}^3$.

Таким образом, нами показано, что пределом обнаружения гексафторида серы в образцах крови составляет – $0,025 \text{ мкмоль/дм}^3$ (3,6 ppb), а рассчитанный из него предел количественного определения $0,05 \text{ мкмоль/дм}^3$ (7,3 ppb). Тем самым удалось добиться при анализе образцов со сложной матрицей чувствительности методики, сопоставимой с аналогичными методиками, применяемыми для определения ГС в атмосфере [71].

4.2. Градуировочная зависимость гексафторида серы

Для определения диапазона линейности исследованы градуировочные зависимости (образцы для контроля), которые представляли собой модельные растворы гексафторида серы 0,06; 0,09; 0,12; 0,15; 0,3; 1,5; 3; 10; 15 мкмоль/дм³, приготовленные путем разбавления насыщенного раствора (глава 2). Сравнительная (обобщенная) хроматограмма приведена на рисунке 20.

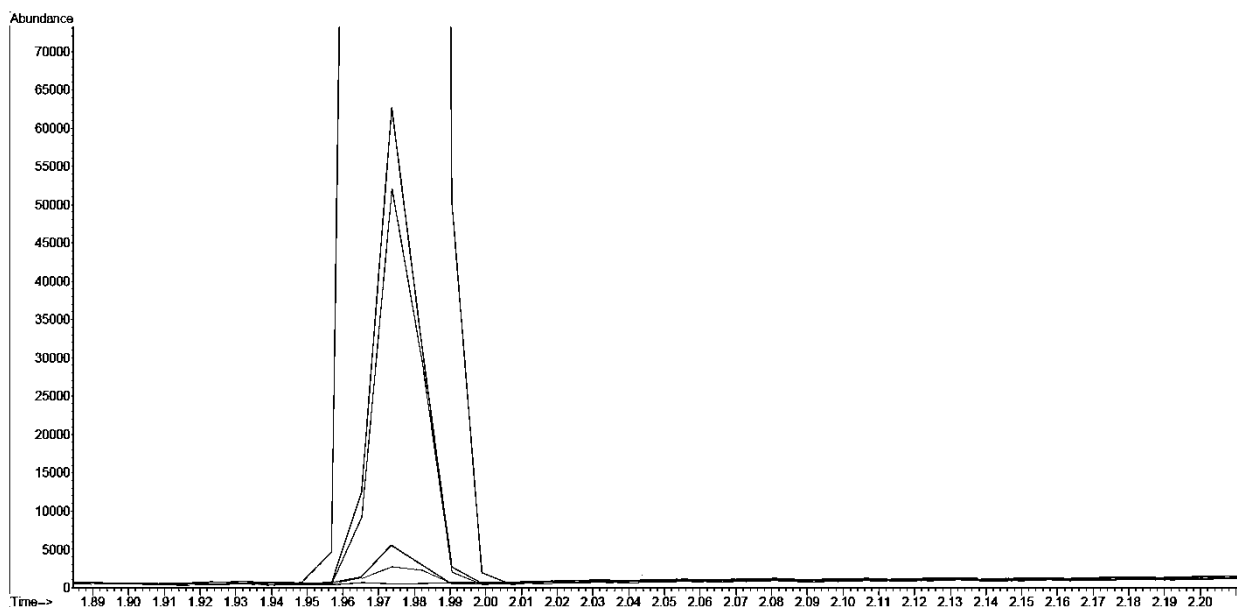


Рисунок 20 – Хроматограммы модельных растворов в диапазоне концентраций ГС 0,06 – 15 мкмоль/л.

Из полученных хроматограмм определили площадь пиков анализируемого компонента смеси (гексафторида серы) и площадь пика внутреннего стандарта (толуола).

По аналитическому сигналу ГС построены графики зависимости в координатах: отношение площадей пиков гексафторида серы к площади пиков толуола $\frac{S(SF_6)}{S(C_6H_5CH_3)}$ от отношения их концентраций $\frac{C_{SF_6}}{C_{BP}}$ (рисунок 21) и $\frac{S(SF_6)}{S(C_6H_5CH_3)} = f(C_{SF_6})$ (градуировочная зависимость ГС) (рисунок 22).

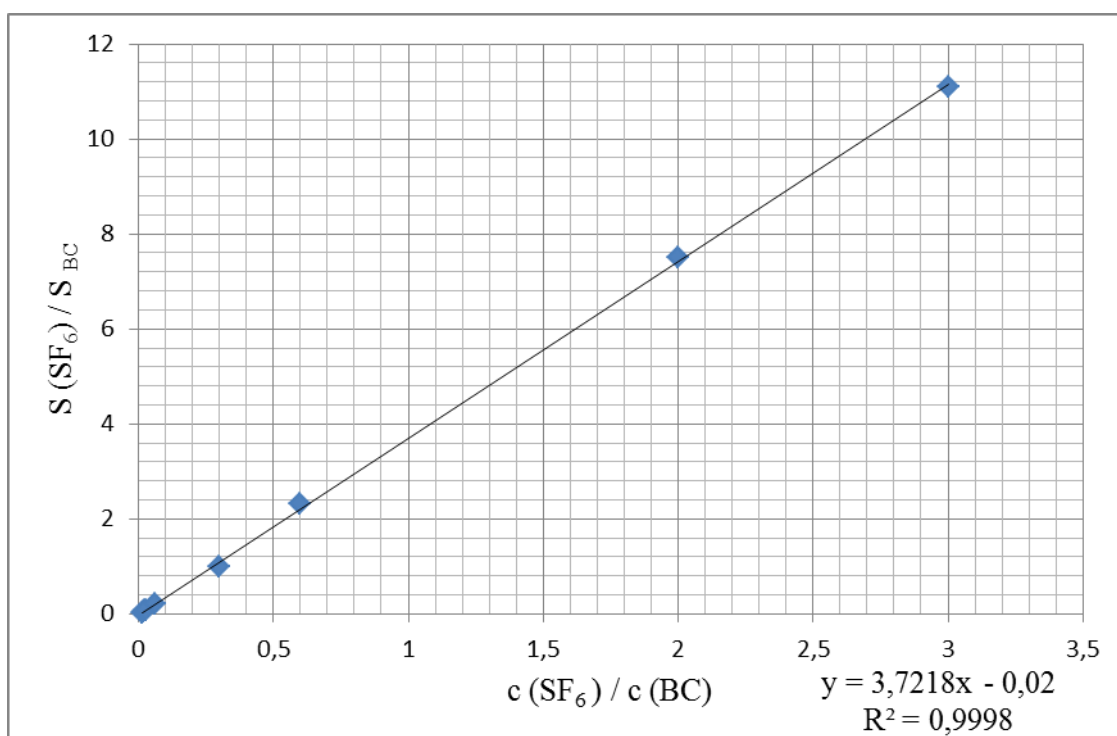


Рисунок 21– – Зависимость отношения площади пика гексафторида серы к площади пика внутреннего стандарта – толуола от отношения их концентраций.

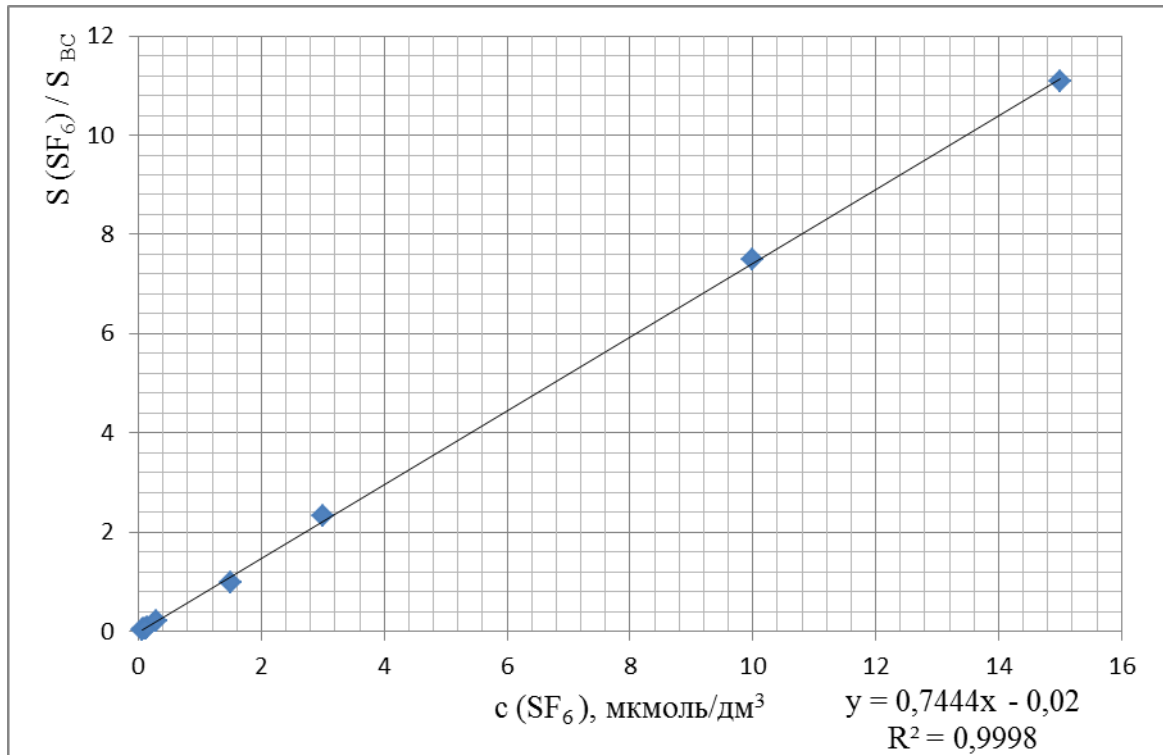


Рисунок 22 – Градуировочная зависимость гексафторида серы в диапазоне 0,06–15 мкмоль/дм³

Исходя из полученной зависимости: коэффициент корреляции (r^2) составил 0,9998, а уравнение прямой $\frac{S_{\text{SF}_6}}{S_{\text{BC}}} = 0,7444 \times c(\text{SF}_6) - 0,02$, следовательно, из полученных данных можно говорить о линейности зависимости отношения площадей пиков ГС и внутреннего стандарта от концентрации ГС, в условиях, реализуемых по данной методике в диапазоне концентраций 0,06–15 мкмоль/дм³. Верхняя граница которого обусловлена максимальным ожидаемым содержанием гексафторида серы в крови после введения терапевтических доз препарата.

Проверку гипотезы линейности графика и оценку адекватности модели провели по методике, описанной в работе [6]. Для оценки правильности результатов, полученных с использованием уравнения зависимости потребовалось произвести предварительную оценку адекватности модели. Для этой цели составили таблицу зависимости отношения площадей пиков ГС и ВС от отношения их концентраций $\left(\frac{S_{\text{SF}_6}}{S_{\text{BC}}}\right) = f\left(\frac{C_{\text{SF}_6}}{C_{\text{BP}}}\right)$ (таблица 24).

Таблица 24 – Экспериментальные значения $\left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}}\right) = f\left(\frac{C_{SF_6}}{C_{BP}}\right)$

i	$C_{BC},$ мкмоль/дм ³	$C_i,$ мкмоль/дм ³	$\frac{C_{SF_6}}{C_{BP}}$	S_m SF ₆	S_m BC	$\left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}}\right)_m$	$\overline{\left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}}\right)}$
1.	5,0	0,06	0,012	3559	146701	0,02426	0,02116
				2701	134843	0,02003	
				2963	154283	0,01920	
2.		0,09	0,018	4857	138456	0,03508	0,03980
				5197	119873	0,04335	
				5982	146035	0,04096	
3.		0,12	0,024	9157	158672	0,05771	0,06315
				11078	156724	0,07068	
				10012	163983	0,06106	
4.		0,15	0,03	13498	152443	0,08854	0,08810
				12144	124438	0,09759	
				11025	141058	0,07816	
5.		0,3	0,06	27858	146787	0,18979	0,21010
				32848	156843	0,20943	
				29915	129455	0,23108	
6.		1,5	0,3	138186	126701	1,09065	0,99187
				150178	161011	0,93272	
				130841	131913	0,99187	
7.		3,0	0,6	309217	132435	2,33486	2,31856
				357587	165754	2,15734	
				311568	126475	2,46347	
8.		10	2	1122846	151615	7,40590	7,49470
				1179546	165483	7,12790	
				1121453	141058	7,95030	
9.		15	3	1747237	152414	11,46376	11,08734
				1655534	146873	11,27187	
				1684056	159984	10,52640	

Проведя расчет дисперсии воспроизводимости изменений с использованием данных независимых экспериментов таблицы 24, получили:

$$S_{\text{Вос}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^9 \sum_{m=1}^3 \left[\left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}} \right)_{im} - \left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}} \right)_i \right]^2}{i \times (m-1)} = 0,05$$

Для оценки адекватности модели составили таблицу (таблица 25), в которой $\left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}} \right)_i^*$ – расчетное значение по градуировочному графику (рисунок 9).

Таблица 25 – Расчет оценки адекватности модели.

i	$C_{BC},$ мкмоль/дм ³	$C_i,$ мкмоль/дм ³	$\frac{C_i}{C_{BP}}$	$\overline{\left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}}\right)}$	$\left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}}\right)^*_i$	$\left[\left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}}\right) - \left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}}\right)^*_i\right]^2$
1.	5	0,06	0,012	0,021	0,026	$2,81 \times 10^{-5}$
2.		0,09	0,018	0,040	0,049	$8,03 \times 10^{-5}$
3.		0,12	0,024	0,063	0,071	$6,24 \times 10^{-5}$
4.		0,15	0,03	0,088	0,093	$2,74 \times 10^{-5}$
5.		0,3	0,06	0,210	0,205	$2,83 \times 10^{-5}$
6.		1,5	0,3	1,005	1,096	$831,8 \times 10^{-5}$
7.		3,0	0,6	2,319	2,211	$1164,2 \times 10^{-5}$
8.		10	2	7,495	7,411	$698,9 \times 10^{-5}$
9.		15	3	11,087	11,126	$147,2 \times 10^{-5}$
Σ						$2864,7 \times 10^{-5}$

Проведя расчет дисперсии адекватности с использованием данных независимых экспериментов таблицы 25, получили:

$$S_{\text{ад}}^2 = \frac{m \times \sum_{i=1}^9 \left[\left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}} \right)_i - \left(\frac{S_{SF_6}}{S_{BC}} \right)_i^* \right]^2}{i-1} = \frac{3 \times 0,029}{8} = 0,011$$

Далее провели расчет критерия Фишера (экспериментальный):

$$F^{\text{эскп}} = \frac{S_{\text{ад}}^2}{S_{\text{Вос}}^2} = \frac{0,011}{0,050} = 0,22$$

Табличное значение критерия Фишера для доверительной вероятности $p = 0,05$ и числа степеней свободы (f_1, f_2):

$$f_1 = i-1 = 9-1 = 8;$$

$$f_2 = i \times (m-1) = 9 \times (3-1) = 18.$$

$$F_{p=0,05;f_1=8;f_2=18}^{\text{табл}} = 2,51$$

Таким образом, с учетом неравенства $F^{\text{эскп}} < F_{p=0,05;f_1=8;f_2=18}^{\text{табл}}$, полученная модель описывает процесс адекватно.

4.3. Оценка повторяемости методики количественного определения гексафторида серы в крови

Оценку повторяемости методики количественного определения ГС в крови провели с помощью расчета среднеквадратичного отклонения (СКО) результатов, полученных в условиях повторяемости на 5 уровнях концентраций, включая границы изучаемого диапазона: 0,06; 0,09; 0,12; 1,5 и 15 мкмоль/дм³. Результаты приведены в таблице 26. Проверку на наличие или отсутствие выбросов осуществили с помощью критерия Граббса [8]. Все рассчитанные значения $G_i < G_{\text{табл}}$ (1,715, при $n=5$, $p = 0,95$).

Таблица 26 – Оценка повторяемости методики количественного определения ГС в крови ($n = 6$)

C_i , мкмоль/дм ³	$\bar{C}$, мкмоль/дм ³	S_r	ОСКО, %
14,6	14,8	0,8	5
13,9			
15,8			
15,8			
14,6			
14,2			

C_i , мкмоль/дм ³	$\bar{C}$, мкмоль/дм ³	S_r	ОСКО, %
1,43	1,40	0,11	8
1,24			
1,30			
1,56			
1,46			
1,39			
0,120	0,129	0,013	10
0,137			
0,125			
0,133			
0,147			
0,112			
0,091	0,100	0,010	10
0,109			
0,100			
0,093			
0,113			
0,091			
0,069	0,065	0,008	12
0,078			
0,054			
0,068			
0,061			
0,062			

ОСКО – относительное стандартное отклонение.

Графическое представление зависимости относительного стандартного отклонения (ОСКО) от содержания аналита, определяемого по данной методике представлено на рисунке 23.

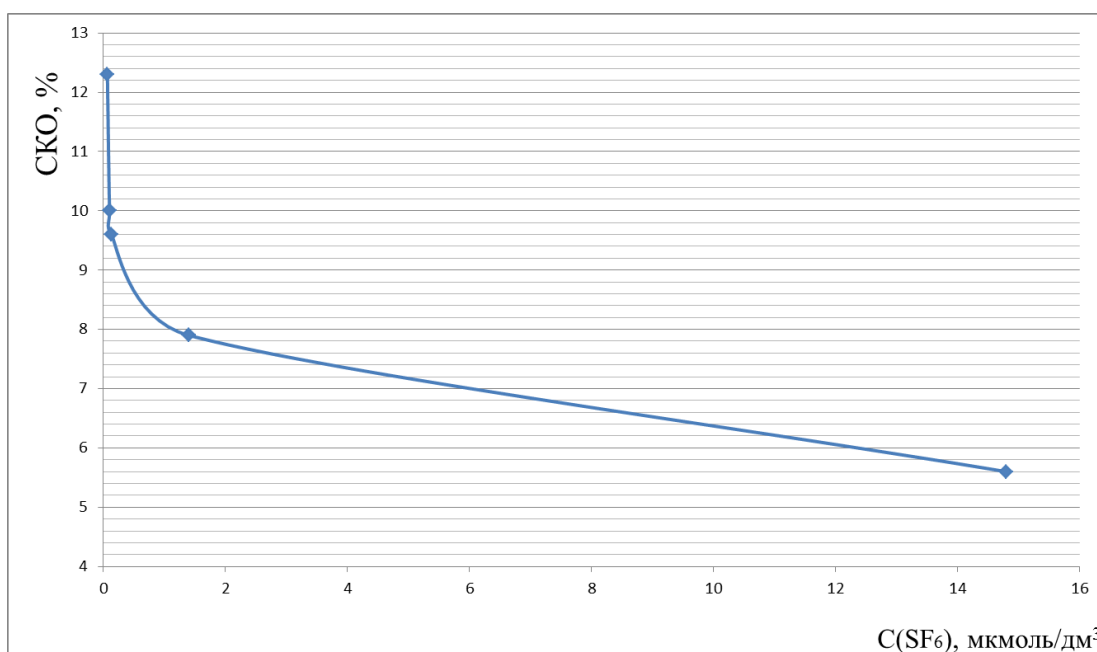


Рисунок 23 – График зависимости относительного стандартного отклонения (ОСКО) повторяемости от концентрации ГС

Значения повторяемости (СКО, %) результатов количественного определения гексафторида серы в диапазоне концентраций 1,5 – 15 мкмоль/дм³ составляют 6 – 8 %, в диапазоне концентраций 0,1 – 1,5 мкмоль/дм³ – 8 – 10 %, а вблизи ПКО сходимость достигает 12 %. Принимая во внимание предъявляемое требование к значению СКО повторяемости для биоаналитических методик [32] допустимое значение СКО(%) не должно превышать 15 % (вблизи ПКО 20 %).

4.4. Оценка внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения гексафторида серы в крови

Для определения внутрилабораторной прецизионности провели следующие расчеты, согласно РМГ 61. Для каждого параллельного определения находили среднее арифметическое:

$$\bar{X} = \frac{\sum X_{l,N}}{N},$$

где N – число параллельных определений, X_l – результат l -ого определения.

Затем для каждой параллели рассчитали дисперсию результатов определения:

$$S_l^2 = \frac{\sum (X_{l,N} - \bar{X}_l)^2}{N - 1}$$

Возможность пренебрежения разбросом провели по критерию Кохрена. Из дисперсий выбирали наибольшее значение S_{max}^2 , и находили сумму всех дисперсий $\sum S_l^2$ и нашли расчетное значение критерия Кохрена:

$$G_{расч} = \frac{S_{max}^2}{\sum S_l^2}$$

Сравнили расчетное с табличным значением $G_{табл}$ для числа степеней свободы $\vartheta = N - 1$ и $f=L$ (L - количество дисперсий, участвующих в расчетах) для доверительной вероятности $p=0,95$. Если соблюдалось условие $G_{расч} > G_{табл}$, то начальное значение S_{max}^2 исключали из выборки и повторяли процедуру расчета $G_{расч}$ со следующим по значению S_{max}^2 и до тех пор, пока не будет выполняться условие $G_{расч} < G_{табл}$. Не исключённые из выборки дисперсии считали однородными и рассчитывали общее среднее по всем параллельным определениям:

$$\bar{X}_l = \sum X_{l,N} / L',$$

L' - количество параллельных определений, которое осталось в выборке.

Расчет среднеквадратичного отклонения (СКО) в условиях промежуточной прецизионности осуществляли по :

$$S_{Rл} = \sqrt{\frac{(X_{l,n} - X_l)^2}{L' - 1}}$$

$S_{Rл} = \sigma_r^*$ – является значением показателя, характеризующим промежуточную прецизионность результатов.

Расчет значения внутрилабораторной прецизионности приведен в Приложении Б. Результаты расчетов представлены в таблице 27.

Таблица 274 – Оценка внутрилабораторной прецизионности ($n=2$, $L = 15$, $P = 0,95$)

Введенная концентрация ГС в модельный раствор, мкмоль/дм ³	Общее арифметическое по 15 параллелям, мкмоль/дм ³	СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{Rл}^* = S_{Rл}$	ОСКО, %
15,0	14,7	0,9	6
1,50	1,47	0,12	8
0,120	0,127	0,013	10
0,090	0,099	0,011	11
0,060	0,064	0,009	14

ОСКО – относительное стандартное отклонение.

Таким образом, показали, что полученные значения ОСКО в условиях внутрилабораторной прецизионности в широком диапазоне концентраций не превышают 14 %.

4.5. Оценка правильности методики количественного определения гексафторида серы в крови

Для исключения (или определения вероятности) появления систематической погрешности, вызванной рядом изменяющихся факторов провели расчеты показателя правильности измерений в установленных рабочих условиях.

Оценку правильности методики провели методом «введено-найдено», т.к. установлено, что влияющие факторы подготовленной пробы не оказывают значимого вклада в погрешность результатов анализа по данной методике (раздел 3), а также по причине отсутствия методик, правильность которых доказана в установленном порядке.

Для этого подготовили образцы крови, в которые сделали добавку рассчитанного количества раствора ГС в гептане. Расчет показателей правильности провели согласно разделу 5.3 «Оценка показателя правильности методики» [29]:

1. Рассчитали значение смещения Θ – как разность между средним значением результатов анализа X_i и введенным значением C_i (известная добавка определяемого компонента):

$$\theta_i = X_i - C_i \quad (i = 1, \dots, M)$$

2. Проверили значимость вычисленных значений Θ_i по критерию Стьюдента, для этого рассчитывали значение t-критерия:

$$t_i = \frac{|\theta_i|}{\sqrt{\frac{S_i^2}{L} + \frac{\Delta_{O,i}^2}{3}}},$$

где $S_i^2 = \frac{\sum (X_{i,l} - X_i)^2}{L-1}$ – дисперсия, характеризующая разброс средних результатов единичного анализа $X_{i,l}$ относительно среднего значения результатов анализа X_i ; $\Delta_{o,i}^2$ – погрешность стандартного раствора ГС.

3. Сравнили полученные значения критерия Стьюдента (t_i) с табличными ($t_{\text{табл}}$) при числе степеней свободы $f = 6-1 = 5$ и доверительной вероятности $P=0,95$ и далее оценили значимость или незначимость лабораторного смещения на фоне случайного разброса.

4. С учетом принятого решения о значимости, либо незначимости лабораторного смещения провели расчет правильности по:

$$\Delta_{c,i}^* = 1,96 \times \sqrt{\frac{S_i^2}{L} + \frac{\Delta_{o,i}^2}{3}}$$

Результаты оценки правильности разработанной методики приведены в таблице 28.

Таблица 28 – Результаты оценки правильности методики количественного определения ГС в крови (n=6)

Исходная концентрация ГС, мкмоль/дм ³	Введено, мкмоль/дм ³	Найдено, мкмоль/дм ³	Θ_i , мкмоль/дм ³	t_i	$t_{\text{табл}}$	$\Delta_{c,i}^*$
0	15,0	14,8±0,9	0,2	0,44	2,57	0,8
	1,50	1,40±0,12	0,10	1,95		0,096
	0,120	0,130±0,013	0,009	1,68		0,009
	0,090	0,097±0,010	0,007	1,96		0,007
	0,060	0,070±0,009	0,011	2,55		0,005

Таким образом, для концентраций исследуемых концентраций $t_i \leq t_{\text{табл}}$, следовательно, оценка смещения незначима на фоне случайного разброса и Θ_i

принята равной нулю. Другими словами, результат количественного определения гексафторида серы с использованием разработанной методики не отягощен систематической погрешностью.

4.6. Оценка показателя точности методики количественного определения гексафторида серы в крови

Оценку показателя точности провели по значениям характеристик случайной и систематической погрешности [29].

$$\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = |\Delta^*| = \theta + 1,96 \cdot \sqrt{(\sigma_{\text{Rл}}^*)^2 + (\sigma_{\text{с}}^*)^2}$$

Результаты расчета приведены в таблице 29.

Таблица 29 – Результаты расчета точности методики определения ГС в крови методом ГХ-МС

C_i , мкмоль/дм ³	$\sigma_{\text{Rл}}^*$	$(\sigma_{\text{Rл}}^*)^2$	$(\Delta_{\text{с},i}^*)$	$(\Delta_{\text{с},i}^*)^2$	$\pm \Delta^*$, мкмоль/дм ³	$\pm \Delta^*$, %
15,0	0,9	0,81	0,8	0,64	2,2	15
1,50	0,12	$14,6 \times 10^{-3}$	0,1	0,01	0,26	17
0,120	0,013	$16,9 \times 10^{-5}$	0,011	$12,1 \times 10^{-5}$	0,027	23
0,090	0,011	$12,1 \times 10^{-5}$	0,008	$6,4 \times 10^{-5}$	0,023	26
0,060	0,008	$6,4 \times 10^{-5}$	0,008	$6,4 \times 10^{-5}$	0,018	29

На рисунке 24 отражена графическая зависимость значения величины точности (в %) для исследованных уровней концентрации.

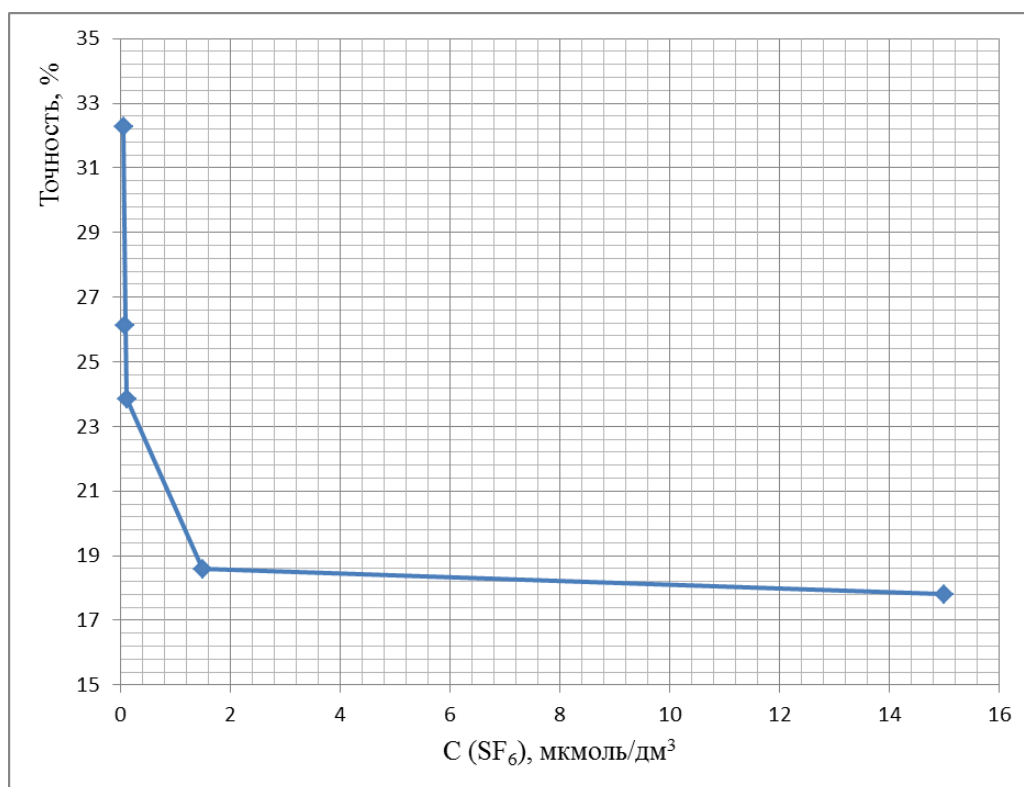


Рисунок 24 – Изменение значения точности методики определения гексафторида серы в крови методом ГХ-МС

Из приведенной зависимости видно, что в широком диапазоне концентраций гексафторида серы точность изменяется от 15 до 29 %.

Таким образом, из проведенной работы установлены следующие метрологические характеристики методики определения гексафторида серы в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (таблица 30).

Таблица 30 – Значения показателей точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности методики определения ГС в крови методом ГХ-МС ($P=0,95$; .

С, мкмоль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{RЛ}^*$, %	$\Delta_{c,i}^*$, %	$\pm\Delta^*$, %
15	5	6	5	15
1,5	8	8	6	17
0,12	10	10	7	23

$C, \text{ мкмоль/дм}^3$	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RЛ}^*, \%$	$\Delta_{c,i}^*, \%$	$\pm\Delta^*, \%$
0,09	10	11	8	26
0,06	12	14	9	29

Из приведенных данных можно сделать вывод, что показатель точности при определении ГС в крови методом ГХ-МС не превышает 30 %; а показатели повторяемости и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности 12 и 14 %, соответственно.

Выводы по главе 4

Таким образом, проведена метрологическая оценка методики количественного определения гексафторида серы в крови методом хромато-масс-спектрометрии, по основным показателям: предел обнаружения, предел количественного определения, повторяемость ($\sigma_r^* \leq 12 \%$), внутрилабораторная прецизионность ($\sigma_{Rл}^* \leq 14 \%$), правильность ($\Delta_{c,i}^* \leq 9 \%$) и точность ($\Delta^* \leq 29 \%$).

Главным центром гигиены и эпидемиологии ФМБА России (г. Москва) проведена метрологическая экспертиза методики, в заключение которой методика рекомендована к проведению аттестации.

ГЛАВА 5. АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В КРОВИ МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Целью настоящей главы являлась апробация методики определения ГС в крови экспериментальных животных, которым был введен УЗИ-контрастный препарат на основе гексафторида серы. Репрезентативная хроматограмма, полученная по разработанной методике, представлена на рисунке 25. Препарат вводился животным (крысы и кролики) в дозировках 4 мкл/кг и 15 мкл/кг. Кровь отбиралась у животных (6 на одну временную точку) через установленные промежутки времени и замораживалась при -40°C . Перед анализом кровь размораживали, отбирали аликвоту 1 см^3 , затем добавляли 2 мл раствора внутреннего стандарта (5 мкмоль/дм^3) в гептане и помещали в лабораторный смеситель типа «вортекс» (2000 об/мин, 20 секунд). Далее раствор центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 минут и отбирали гептановый слой в виалу, которую герметично закрывали. Концентрацию гексафторида серы в крови выражали в мкмоль/дм^3 . Расчет фармакокинетических параметров ГС описан в главе 2.

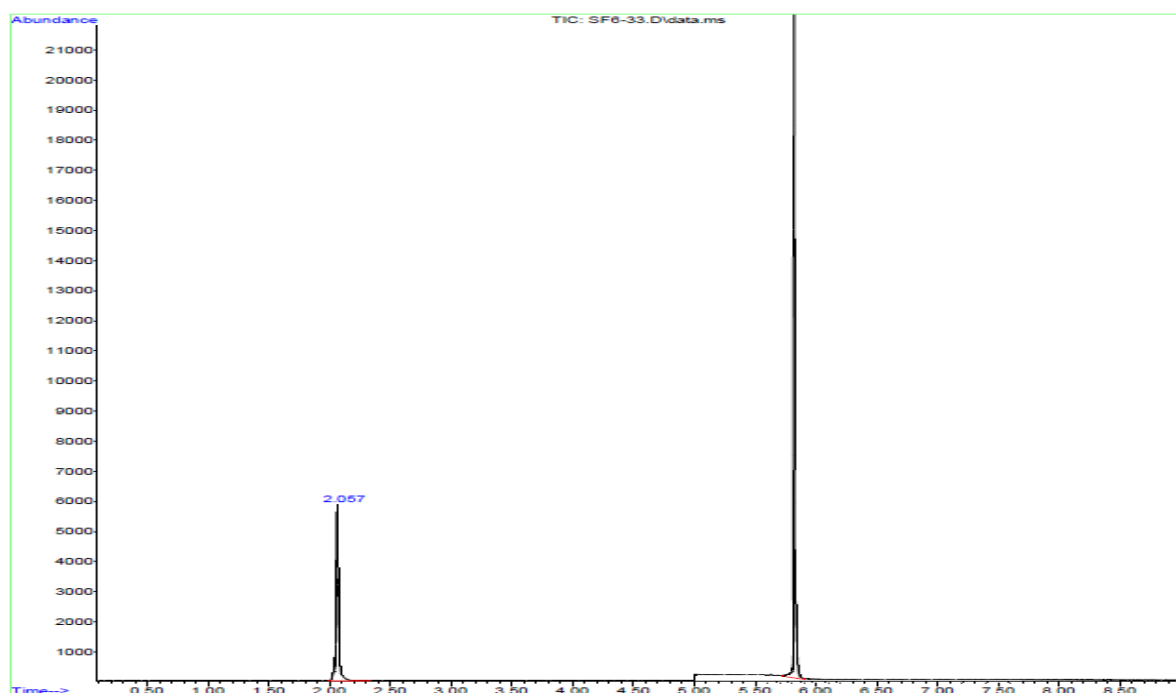


Рисунок 25 – Хроматограмма образца, полученного от экспериментального животного ($t = 15$ мин; дозировка 15 мкл/кг)

На первом этапе работы изучение фармакокинетических параметров проводили на крысах, результаты определения ГС после введения 4 и 15 мкл/кг массы животного в крови представлены в таблицах 31-32.

Таблица 31 – Концентрация гексафторида серы в крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 15 мкл/кг

	Концентрация SF ₆ , мкмоль/дм ³				
Время, мин	3	5	10	15	20
C _{ср} , мкмоль/дм ³	8,1±0,09	2,92±0,09	0,95±0,02	0,20±0,01	< 0,06

Таблица 32 – Концентрация гексафторида серы в крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг

	Концентрация SF ₆ , мкмоль/дм ³			
Время, мин	3	5	10	15
C _{ср} , мкмоль/дм ³	0,44±0,01	0,25±0,01	0,18±0,01	< 0,06

При изучении фармакокинетического профиля (рисунок 26) ГС при двух дозировках в крови крыс была определена только одна фаза снижения концентрации ГС - в первые 4 минуты происходит резкое снижение концентрации ГС. Рассчитанный полупериод элиминации составляет 5,8 мин.

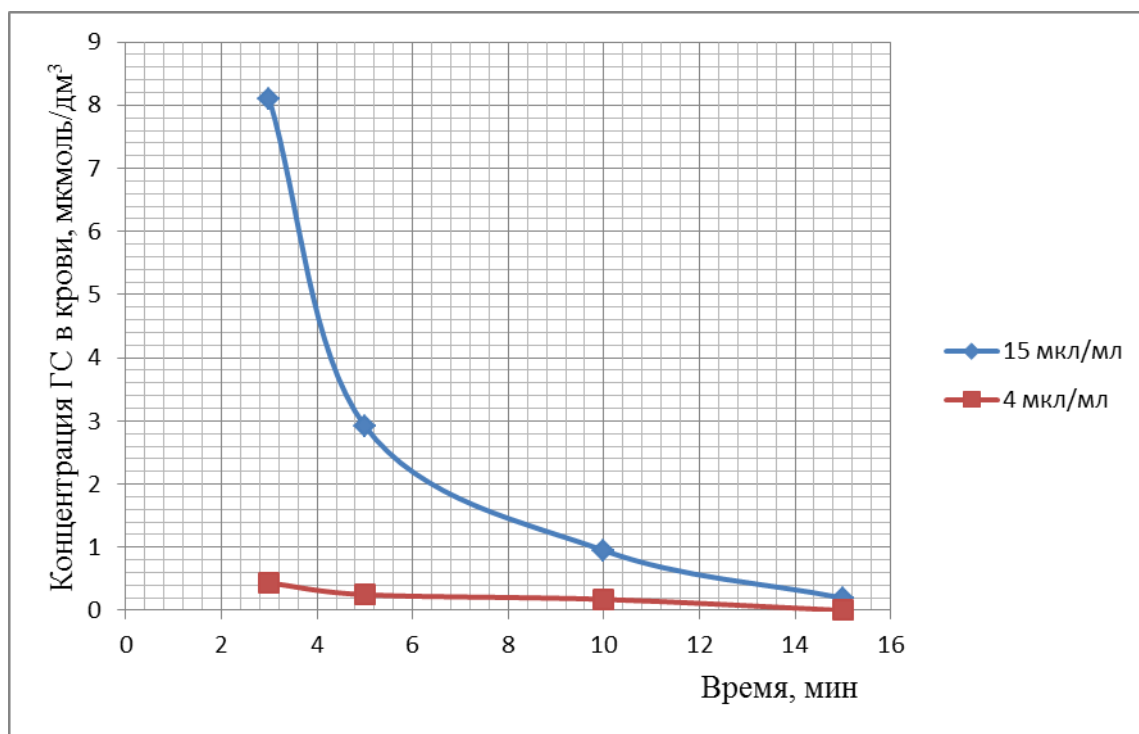


Рисунок 26 – Фармакокинетический профиль гексафторида серы в дозировках 15 и 4 мкл/кг (крысы).

На основании построенной зависимости были рассчитаны фармакокинетические показатели ГС для дозировки 15 мкл/кг для крыс (таблица 33).

Таблица 33 – Параметры фармакокинетики гексафторида серы у крыс после внутривенного введения в дозе 15 мкл/кг.

V_d , мл/кг	Cl , мл/(кг*ч)	MRT , мин	k_{el} , ч ⁻¹	$T_{1/2}$, мин
1231,63	11007,38	8,42	7,12	5,84

Значение среднего времени удерживания MRT 8,42 мин свидетельствует о быстром выведении его из организма

Поскольку изучение фармакокинетики лекарственного препарата подразумевает использование нескольких видов животных, препарат так же вводили кроликам в дозировке 4 мкл/кг, результаты определения ГС в крови представлены в таблице 34.

Таблица 34– Концентрации гексафторида серы в крови (мкмоль/дм³) кроликов после однократного внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг.

	Концентрация SF ₆ , мкмоль/дм ³				
Время, мин	3	5	10	15	20
С _{ср} , мкмоль/дм ³	8,07±0,10	2,92±0,09	0,95±0,02	0,20±0,01	< 0,06

При изучении фармакокинетического профиля (рисунок 27) препарата на основе ГС у кроликов, также как и у крыс, обнаружена одна фаза выведения. Концентрация гексафторида серы равномерно снижалась до предела определения в течение 10 – 15 минут. Полупериод элиминации – составил 2,35 минуты.

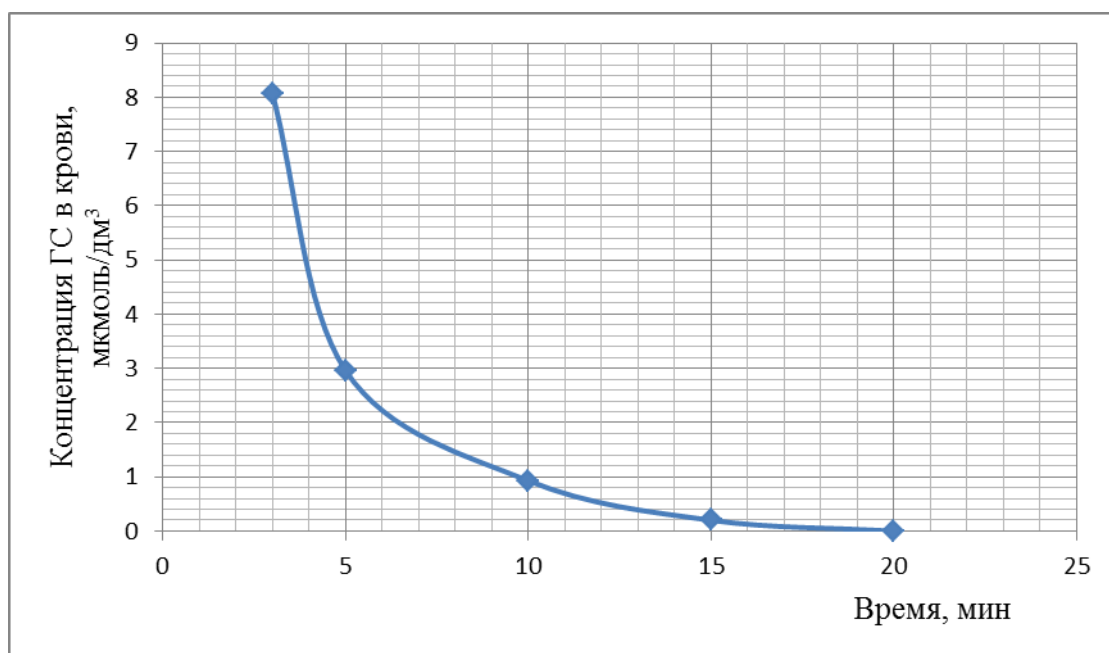


Рисунок 27 – Фармакокинетический профиль препарата на основе гексафторида серы в дозировке 4 мкл/кг (кролики).

На основании построенной зависимости были рассчитаны фармакокинетические показатели ГС для дозировки 4 мкл/кг для кроликов (таблица 35).

Таблица 35 – Параметры фармакокинетики гексафторида серы у кроликов после внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг.

V_d , мл/кг	Cl, мл/(кг*ч)	MRT, мин	k_{el} , ч ⁻¹	$T_{1/2}$, мин
10,88	176,36	3,40	17,66	2,35

Дальнейшим этапом работы являлась оценка возможного накопления ГС, которую проводили по средствам семикратного введения препарата кроликам в дозе 4 мкл/кг с интервалом 24 часа. После седьмого дня эксперимента оценивали концентрацию гексафторида серы и рассчитывали параметры. Результаты определения концентраций ГС в крови кроликов после курсового введения (7 дней) представлены в таблице 36.

Таблица 36– Концентрации гексафторида серы в крови кроликов (мкмоль/дм³) после многократного внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг

	Концентрация SF ₆ , мкмоль/дм ³				
Время, мин	3	5	10	15	20
C_{cp} , мкмоль/дм ³	8,07±0,10	2,96±0,14	0,93±0,02	0,20±0,01	< 0,06

В результате эксперимента не было выявлено статистически значимых различий после однократного и многократного введения препарата. Таким образом, можно заключить, что эффект кумуляции лекарственного средства при многократном введении отсутствует.

Для оценки дозозависимости изучены фармакокинетические профили ГС при внутривенном введении кроликам в дозах 4, 6 и 8 мкл/кг. Результаты

количественной оценки концентраций ГС в крови кроликов представлены в таблице 37.

Таблица 37 - Концентрации гексафторида серы в крови кроликов (мкмоль/дм³) после однократного внутривенного введения в дозах 4, 6, 8 мкл/кг

Время, мин	Концентрация SF ₆ , мкмоль/дм ³				
	3	5	10	15	20
C _{ср} , мкмоль/дм ³ при 4 мкл/кг	8,1±0,1	2,92±0,09	0,95±0,02	0,20±0,01	< 0,06
C _{ср} , мкмоль/дм ³ при 6 мкл/кг	9,7±0,2	3,73±0,17	1,07±0,03	0,22±0,01	< 0,06
C _{ср} , мкмоль/дм ³ при 8 мкл/кг	12,9±0,3	4,64±0,06	1,38±0,11	0,27±0,01	< 0,06

Для проверки линейности фармакокинетики исследуемого вещества проводили сравнение фармакокинетических кривых (рисунок 28) полученных при введении его в различных дозах и фармакокинетических параметров.

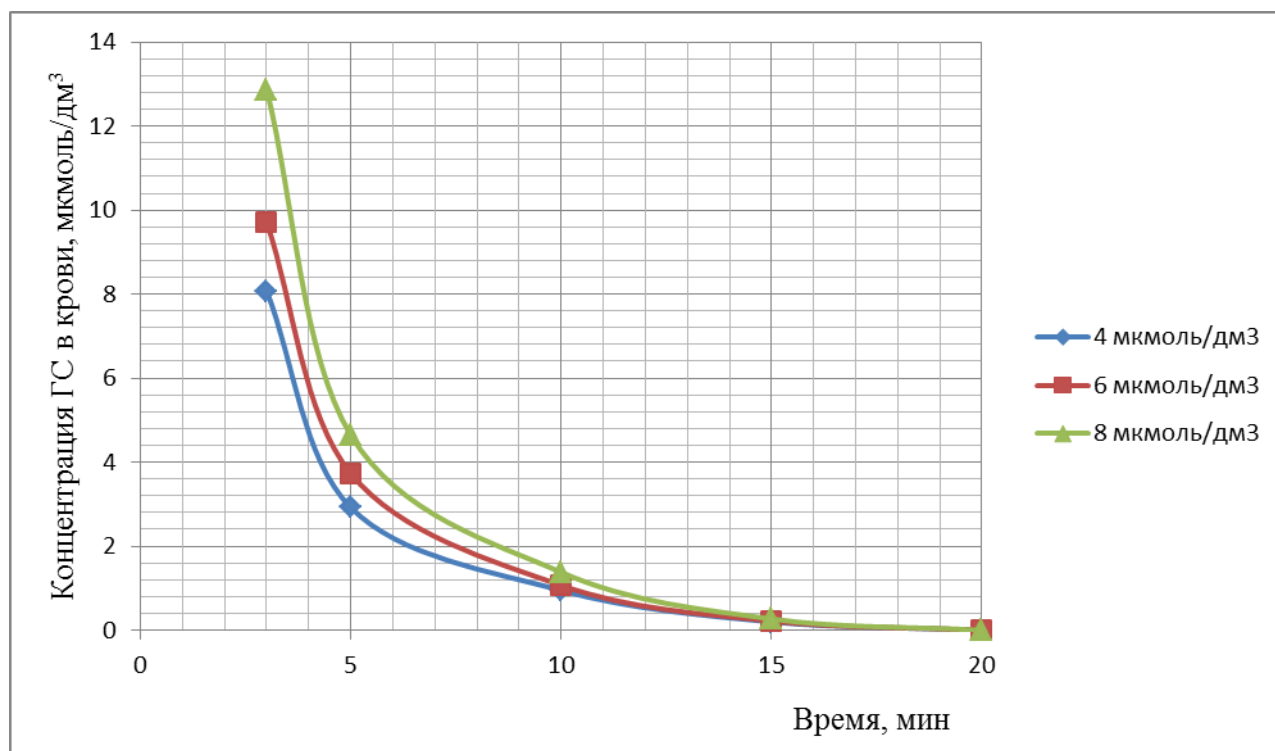


Рисунок 28 – Профиль концентраций ГС в крови кроликов после внутривенного введения в дозах 4, 6 и 8 мкл/кг

На основании полученных данных строили зависимость $AUC = f(D)$ (рисунок 29).

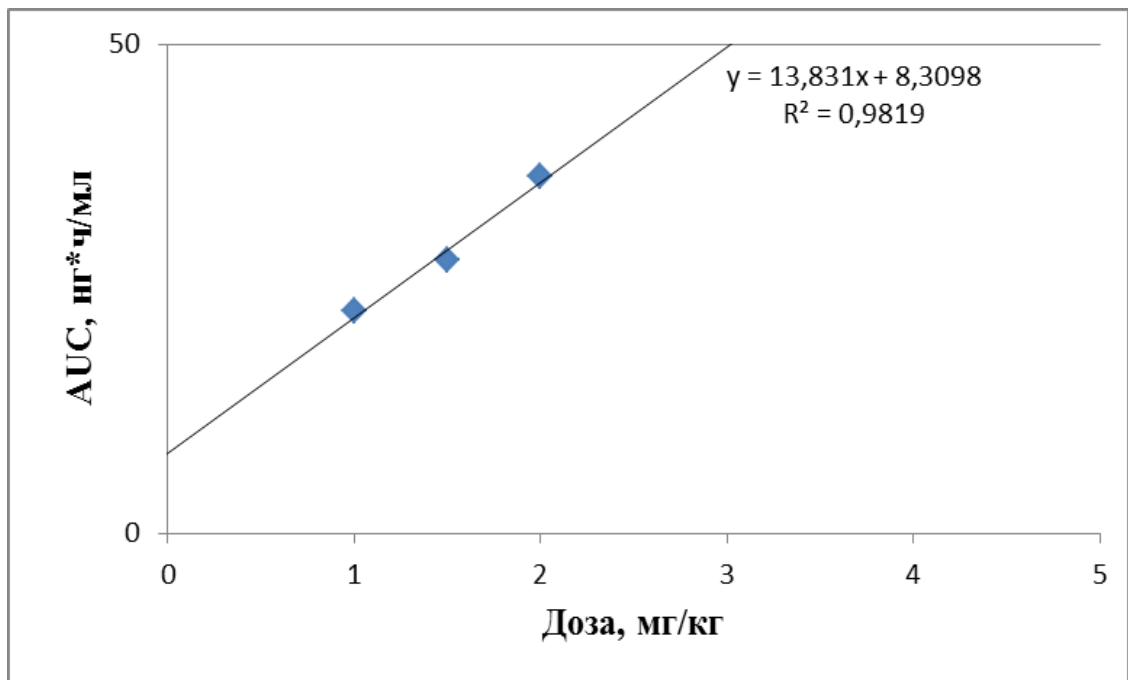


Рисунок 29 – Зависимость AUC от исследуемых доз (4, 6, 8 мкл/кг)

Анализ зависимости AUC (площадь под кинетической кривой) от дозы показывает линейную зависимость с коэффициентом корреляции 0,98. Результаты оценки зависимости AUC от дозы показали, что в диапазоне доз от 4 до 8 мкл/кг имеет линейный характер.

Выводы по главе 5.

Проведена апробация разработанной методики в эксперименте на животных: исследована фармакокинетика препарата на основе гексафторида серы в крови крыс и кроликов, получены основные фармакокинетические зависимости, которые согласуются с исследованиями, проведенными на экспериментальных животных по определению ультразвукового-контрастирования: интенсивность акустического сигнала имеет аналогичную зависимость, однако как и предполагалось, после исчезновения УЗ-сигнала, ГС еще обнаруживается в значительных количествах. Иными словами мы доказали ее пригодность для использования в клинической практике.

Оценена возможность накопления гексафторида серы в организме при многократном его введении в кровь, оценены основные фармакокинетические параметры препарата на кроликах через 7 дней курсового введения. Сравнительный анализ не выявил статистически достоверных различий фармакокинетических параметров после однократного и многократного введения, что указывает на отсутствие эффекта кумуляции гексафторида серы.

ВЫВОДЫ

1. Изучено хроматографическое поведение гексафторида серы на капиллярных колонках с различным составом неподвижной фазы. Показано отсутствие сорбции на колонке HP-Innowax при температурах 30 – 50 °С. Определено, что добавка 5 % в состав неподвижной фазы (HP-5ms) фенилполисилоксана уменьшает сорбционные свойства колонки, по сравнению с неподвижной фазой на основе метилполисилоксана (HP-1ms).

2. Проведена оценка влияния температуры источника ионов МС-детектора: при увеличении температуры со 100 до 200 °С, увеличивается общий ток, однако, интенсивность основного иона (127 m/z) снижается на 13 %, а при дальнейшем увеличении температуры до 250 °С происходит еще большая фрагментация иона $[\text{SF}_5]^+$, и, как следствие, снижается интенсивность сигнала ГС. При выбранной рабочей температуре источника ионов 100 °С масс-спектр ГС более чем на 78 % состоит из сигнала иона $[\text{SF}_5]^+$ с 127 m/z, что обеспечивает наибольшую чувствительность.

3. Определены рабочие условия ГХ-МС системы для количественного определения ГС: колонка HP-1MS; температура термостата колонок 40 °С; ввод пробы без деления потока; температура источника ионов 100 °С.

4. Изучены параметры жидкость-жидкостной экстракции ГС из крови при использовании органических неполярных растворителей, обладающих наибольшей растворяющей способностью. На основании чего, разработан алгоритм пробоподготовки образцов крови для определения ГС, заключающийся в извлечении гексафторида серы гептаном; соотношение «кровь : гептан» - 1:2.

5. Предложена методика определения ГС в крови и проведена метрологическая оценка по показателям повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, правильности и точности. Показана линейность градуировочной зависимости ГС в диапазоне концентраций ГС 0,06–15 мкмоль/дм³. Доказано, что

результаты, получаемые с помощью разработанной методики не отягощены систематической погрешностью.

6. Проведено изучение фармакокинетики препарата на основе ГС с помощью разработанной методики на двух видах животных. При изучении фармакокинетического профиля ГС была обнаружена 1 фаза снижения концентрации вещества. Концентрация ГС равномерно снижалась до минимально определяемого уровня в течение 10 – 15 минут. Полупериод элиминации – составил 2,35 минуты. Показано отсутствие кумуляции ГС в организме при многократном введении препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В известной литературе последних 40 лет отсутствуют данные по определению ГС в образцах биоматериала (в частности – крови) с помощью хроматографических методов. Предлагаемый создателями итальянского препарата на основе ГС подход [72] к определению ФК последнего по средствам измерения акустического сигнала не является адекватным, т.к. получаемый сигнал характеризует содержание мицелл лекарственной формы, в которой заключен ГС, а не его концентрацию. В то же время в задачах ФК исследований лежат пего их основе.

Поэтому, учитывая высокую чувствительность и селективность хромато-масс-спектрометрии, а также широкую распространенность данного типа приборов, можно предполагать, что разработанная методика будет внедрена в практику учреждений медицинского и фармацевтического профиля.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГС – гексафторид серы.

ГХ-МС – газовая хроматография-масс-спектрометрия (хромато-масс-спектрометрия).

ДЭЗ (ЭЗД) – детектор электронного захвата.

ppm (part per million) – миллионная часть (10^{-6}).

sub-ppm – ppb, ppt .

ppb (part per billion) – миллиардная часть (10^{-9}).

ppt (part per trillion) – триллиардная часть (10^{-12}).

AUC – площадь под экспериментальной кривой концентрации гексафторида серы в крови за исследуемый период;

Cl – общий клиренс;

V_d – кажущийся объем распределения гексафторида серы;

$T_{1/2}$ – период полувыведения гексафторида серы;

MRT – среднее время удерживания гексафторида серы в организме;

k_{el} – константа элиминации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы: в 2 т.: пер. с англ. Т. 2 / Под ред. Р. Кельнера, Ж. Мерме и др. – М.: Мир. 2004. – 298 С.
2. Андреев Ю.А. Идентификация и определение хлорированных фенолов в воде после дериватизации ангидридом монохлоруксусной кислоты газохроматографическим методом / Ю.А. Андреев, М.С. Черновьянц, В.Е. Морозова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2014. – Т. 14. – Вып. 3. – с. 449-457
3. Бланк А. Б. О нижней границе определяемых содержаний и пределе количественного определения с учетом требования воспроизводимости результатов анализа. / Химико-фармацевтический журнал. – 1979 – Т. 34. – № 1. – С. 5 – 9.
4. Бродский Е. С. Применение фторсодержащих соединений в качестве внутренних стандартов при анализе объектов окружающей среды / Бродский Е. С., Ключев Н. А., Русинов В. Л., Уломский Е.Н.// Аналитика и контроль. – 1999. - №3. – С.49-53
5. Вульфсон Н.С. Масс-спектрометрия органических соединений/ Вульфсон Н.С., Заикин В.Г., Микая А.И. – М. : Химия. 1986. – 312 с.
6. Гармаш А. В. Метрологические основы аналитической химии / Гармаш А. В., Сорокина Н. М. // М: Изд. МГУ им. М. В. Ломоносова. 2012. – 47 с.
7. ГОСТ Р ИСО 11843-2-2007. Способность обнаружения – Часть 2: Методология в случае линейной калибровки. – М.: Стандартинформ. 2007. – 24 С.
8. ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. – М.: Стандартинформ. 2009. – 51 С.
9. ГОСТ Р 52361 - 2005. Аналитический контроль: Основные термины и определения. – М.: Стандартинформ. 2008. – 17 С.
10. Дворкин В.И. Метрология и обеспечение качества количественного химического анализа / – М.: Химия. 2001. – 263 с.

11. Дёрффель К. Статистика в аналитической химии. – М: Мир. 1994. – 267 с.
12. Завилопуло А. Н. Пороговая ионизация молекулы гексафторида серы электронным ударом / А. Н. Завилопуло, О. Б. Шпеник, А. В. Снегурский, Ф.Ф. Чипев, В.С. Вукстич // Письма в ЖТФ – 2005. – Т.31. вып.18. – С. 44– 49.
13. Зенкевич И. Г. Особенности метода стандартной добавки для количественного определения аналитов в сложных матрицах, обладающих сорбционными свойствами / Зенкевич И. Г., Морозова Т.Е. // Аналитика и контроль. – 2010. – Т.14. - №3. – С.164-171
14. Зенкевич И. Г. Новые возможности количественного хроматографического анализа методом двойного внутреннего стандарта / И. Г. Зенкевич, К. М. Королев // Аналитика и контроль – 2014 – №4 – С. 469-476
15. Кельнер Р. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. Том 2./ Кельнер Р., Мерме Ж.-М., Отто М., Видмер Г.М. – М.: Мир. 2004. – 728 с.
16. Коренман, И, М, Экстракция в анализе органических веществ / И. М. Коренман. – М.: Химия. 1987. – 200 с.
17. Кривошеков, С. В. Валидация методики количественного определения гексафторида серы в новом контрастном препарате методом газовой хроматографии / С. В. Кривошеков, М. С. Ларькина, С. С. Власов, Л. А. Дрыгунова, А. М. Гурьев, М. В. Белоусов, М. С. Юсубов // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т.51. – № 3. – С. 41-44.
18. Кривошеков, С.В. Валидация методики определения гексафторида серы в образцах плазмы экспериментальных животных / С.С. Власов, С.В. Кривошеков, М.К. Заманова, М.В. Белоусов, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №4(17). – С.174-179
19. Кривошеков, С.В. Характеристика полисахаридных комплексов василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.) и василька ложнопятнистого (*Centaurea pseudomaculosa* Dobrocz.) / М.С. Ларькина, С.В. Кривошеков, А.М. Гурьев, Т.В. Кадырова, Е.В. Ермилова, В.В. Коцерубская, М.С. Юсубов // Химия растительного сырья. – 2016. – № 2. – С.19-24

20. Кривошеков, С.В. Водорастворимые полисахариды травы люцерны посевной *Medicago sativa* (Fabaceae) флоры Красноярского края / К.И. Ровкина, С.В. Кривошеков, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов // Химия растительного сырья. – 2017. – №2. – С.57-64
21. Крылов В. А. Хромато-масс-спектрометрический анализ гексафторида серы, обогащенного изотопом ^{34}S / В. А. Крылов, А. Ю. Созин, О. Ю. Чернова и др. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2016. – Т. 82. – №6 – С. 17-21
22. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М.: Бинوم. Лаборатория знаний, 2003. – 493 с.
23. Макаров Е. Д., Зенкевич И. Г. Сравнение модифицированных методов двойного внутреннего стандарта и стандартной добавки для количественного газохроматографического анализа компонентов гетерогенных смесей / Е. Д. Макаров, И. Г. Зенкевич// Вестник СПбГУ. – 2007. – Т.4. – №2 – С. 80-87
24. Нейман Е. Я., Рекомендации по метрологической оценке результатов определений. / Нейман Е. Я., Каплан Б. Я. // Ж. аналит. химия. – 1978. – Т. 33. – № 3. – с. 607 – 609.
25. Новак Й. Количественный анализ методом газовой хроматографии / Пер. с англ.; Под ред. К. И. Сакодынского. – М. : Мир. 1978. – 180 с.
26. Новоторов Ю.Н. Состав газообразных продуктов взаимодействия гексафторида серы с гидридом кальция / Новоторов Ю.Н., Фещенко И.А., Спирина Т.Л., Циновой Ю.Н., Тайнов А.В., Медянцев В.Е. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия: Химия. – 2000 – №1 – С. 26-30
27. Опаловский А. А., Гексафторид серы / Опаловский А. А., Лобков Е. У. // Успехи химии. 1975. – Т. 44. – № 2. – С. 193–213.
28. Отто М. Современные методы аналитической химии. 2-е изд. испр. – М.: Техносфера, 2006. – 416 с.

29. РМГ 61-2010 Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки / – М.: Стандартиформ, 2013. – 62 с.
30. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
31. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 1 / – М.: Гриф и К, 2013. – 328 с.
32. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа. /Л.: Химия, 1984. – 168 с.
33. Экспериандова Л. П. Еще раз о пределах обнаружения и определения / Л. П. Экспериандова, К. Н. Беликов, С. В. Химченко, Т. А. Бланк // Журнал аналитической химии. – 2010. – Т. 65. – № 3. – с. 229–234.
34. Эпштейн Н. А. Оценка предела количественного определения с учетом требований воспроизводимости результатов анализа. / Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36. – № 11. – с. 52 – 54
35. Ashton J.T. The Solubility of Certain Gaseous Fluorine Compounds in Water / J.T. Ashton, R.A. Dawe, K. W. Miller, E.B. Smith, B. J. Stickings // J. Chem. Soc. A, 1968. – 0. – p. 1793-1796.
36. Bagal D. Gas Phase Stabilization of Noncovalent Protein Complexes Formed by Electrospray Ionization / D. Bagal, E.N. Kitova, L. Liu, A. El-Hawiet, P.D. Schnier, J.S. Klassen. // Anal. Chem. – 2009. – №81. – p. 7801-7806.
37. Bandosz T.J. Adsorption of Sulfur Hexafluoride and Propane at Temperatures near Ambient on Pillared Clays / T.J. Bandosz, J. Jagiello, J.A. Schwarz // J. Chem. Eng. – 1996. – №41. – C. 880-884.
38. Banwart W. L. Gas chromatographic identification of sulfur gases in soil atmospheres / W. L. Banwart, J. M. Bremner // Soil. Biol. Biochem. – 1974. – №6. – p. 113-115.

39. Bolton G.L. Solvated Electron Reaction Rates in Alcohols and Water. Solvent Effect / G.L. Bolton, G.R. Freeman // Journal of the American Chemical Society. – 1976. – №98:22. – p. 6825-6830.
40. Brennwald M.S. Analysis of dissolved noble gases in the pore water of lacustrine sediments / M.S.Brennwald, M. Hofer, F. Peeters, W. Aeschbach-Hertig, K. Strassmann, R. Kipfer D.M. Imboden) // Limnol Oceanogr Methods. – Vol. 1. – Iss. 1. – p. 51–62.
41. Brennwald M.S. Simultaneous analysis of noble gases, sulfur hexafluoride, and other dissolved gases in water / M.S. Brennwald, M. Hofer, R. Kipfer // Environmental Science & Technology. – 2013. – Vol. 45. – Iss. 18. – p. 8599-8608.
42. Childress, J. J. Inorganic carbon uptake in hydrothermal vent tubeworms facilitated by high environmental $p\text{CO}_2$ / J.J. Childress, R.W. Lee, N.K. Saunders, H. Felbeck, D.R. Oros, A. Toulmond, D.Desbruykres, M. C. Kennicutt, J. Brooks, // Nature, 1993. – 362, – p. 147-149.
43. Clemons C. A. Concentration and ultrasensitive chromatographic determination of sulfur hexafluoride for application to meteorological tracing / C.A. Clemons, A. I. Coleman, B.E. Saltzman // Environmental Science and Technology. – 1968. – №2. – p. 551-556.
44. Correias J.M. Human pharmacokinetics of a perfluorocarbon ultrasound contrast agent evaluated with gas chromatography / J-M Correias, A.R. Meuter, E. Singlas, D.R. Kessler, D. Worah, S.C. Quay // Ultrasound Med Biol – 2001. – 27 – P. 565–570.
45. Busenberg E. A rapid method for the measurement of sulfur hexafluoride (SF_6) trifluoromethyl sulfur pentafluoride (SF_5CF_3), and Halon 1211 (CF_2ClBr) in hydrologic tracer studies / E. Busenberg and L.N. Plummer // American Geophysical Union. – 2010. – Vol. 11. – Iss. 11. – p. 1 – 10.
46. Collison H.A. Determination of Carbon Monoxide in Blood by Gas Chromatography / H.A. Collison, F.L. Rodkey, J.D. O'Neal // Clin. Chem. – 1968. – Vol.2. – p. 162-171.

47. Deng F. Low-Temperature cataluminescence sensor for sulfur hexafluoride utilizing coral like Zn-doped SnO₂ composite/ F. Deng, Y. He, G. Shi, B. Li, X. Wua // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2016. – Vol.237. – p. 120-126.
48. Derks C. M. Measurement of sulfur hexafluoride with a Beckman electron capture detector in pulmonary clearance / C. M. Derks // *J. of chromatography* – 1975 – Vol. 108. – p. 222-225.
49. Dietz R.N. Tracing Atmospheric Pollutants by Gas Chromatographic Determination of Sulfur Hexafluoride / R.N. Dietz, E.A.Cote // *Environmental Science & Technology*. – 1973. – Vol.4. – p. 338-342.
50. Documentation for Immediately Dangerous to Life or Health Concentration (IDLH) / National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), NIOSH Chemical Listing and Documentation of Revised IDLH Values, 1994, available: <http://www.cdc.gov/niosh/idlh/intridl4.html> (accessed 8 February 2007).
51. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices /American Conference of Goveenmental Industrial Hygienists (ACGIH), ACGIH, Cincinnati, Ohio, USA, 2002.
52. Graham A. The solubility and entropy of solution of carbon tetrafluoride and sulfur hexafluoride in nonpolar solvents/ Graham A., Hildebrand J.H. // *The Journal of Physical Chemistry*. –1963. – Vol. 67. – Iss.9. – p. 1830-1833.
53. Evans F.E. Fluorine Compounds / F.E. Evans, G. Mani // *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. – vol. 11, John Wiley & Sons, New York, 1994. – pp. 428-442.
54. Fillion J., Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection / J. Fillion, F. Sauve, J. Selwyn // *J. of AOAC Int.* – 2000. – Vol. 83. – №3.– p. 698-713.
55. Friedman H.L. The solubilities of sulfur hexafluoride in water and of the rare gases, sulfur hexafluoride and osmium tetroxide in nitromethane / H.L. Friedman // *J. Am. Chem. Soc.* – 1954. – Vol.76. – Iss.12. – p. 3294-3297.

56. Fu Q. Situation and Analysis of Sulfur Hexafluoride (SF_6) Byproducts of Gas Insulated Switchgear in Guangdong / Q. Fu, Y. Wang, Zh. Li, W. Yao, X. Zhuang // 2010 Asia-Pacific Power and Energy Engineering Conference. – 2010. – p. 1– 4.

57. Ganesan A. L. The variability of methane, nitrous oxide and sulfur hexafluoride in Northeast India // A. L. Ganesan, A. Chatterjee, R. G. Prinn, C. M. Harth, P. K. Salameh, A. J. Manning, B. D. Hall, J. Mühle, L. K. Meredith, R. F. Weiss, S. O'Doherty, D. Young // *Atmos. Chem. Phys.* – 2013. – №13. – p. 10633-10644.

58. Gisselsson L. A gas chromatographic technique for determination of blood flow and metabolism in individual organs (with special reference to the heart) / L. Gisselsson, M. Ericsson, L. Johansson // *Uppsala Journal of Medical Sciences.* – 1980. – Vol.85. – p. 113-124.

59. Goanta M. A gas chromatography method to get reliable Sulphur hexafluoride model validation data / M. Goanta // *Acta chemical iasi.* – 2011. – Vol. 19. – p. 137-141.

60. Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation / CITAC/EURACHEM Guide Edition 2002.

61. Guillot J. G. Quantitative determination of carbon monoxide in blood by head-space gas chromatography / J. G. Guillot, J. P. Weber, and J. Y. Savoie // *J. of Analytical Toxicology.* – 1981. – №5. – p. 264-266.

62. Gullikson C. W. Raman spectrum of sulfur hexafluoride in the gaseous and solid states / C. W. Gullikson, J. Rud Nielsen, and A. T. Stair, Jr. // *J. of molecular spectroscopy.* – 1957. – №1. – p. 151-154.

63. Hall B. D., Improving measurements of SF_6 for the study of atmospheric transport and emissions / B. D. Hall, G. S. Dutton, D. J. Mondeel, J. D. Nance, M. Rigby, J. H. Butler, F. L. Moore, D. F. Hurst, J.W. Elkins // *Atmos. Meas. Tech.* – 2011. – №4. – p. 2441-2451.

64. Hanrahan J.M. Adsorption-desorption gas chromatographic-infrared determination of trace disulfur in sulfur hexafluoride / James M. Hanrahan and Arthur R. Paterson // *J. of Chromatography.* – 1980. – Vol.193. – p. 265-270.

65. Heggen R. Columns for simultaneous gas chromatographic determination of ppt levels of the atmospheric tracers sulphurhexafluoride and bromotrifluoromethane in ambient air samples / R. Heggen and M. Oehme // *J. of Chromatography*. – 1982. – Vol.243. – p. 168-172.
66. Hellgeth J.W. Sulfur Hexafluoride as a mobile phase for supercritical fluid chromatography / J. W. Hellgeth, M. G. Fessehaie and L. T. Taylor // *Chromatographia*. – 1988. – №3. – p. 172-176.
67. Herold I. Volume quantification by contrast-enhanced ultrasound: an in-vitro comparison with true volumes and thermodilution / Herold I.H, Russo G., Misch M., Houthuizen P., Saidov T., van het Veer M., van Assen H.C., Korsten H.H. // *Cardiovasc Ultrasound*. – 2013 – p. 1-9.
68. Hibbs D.E. Sulfur hexafluoride gas tracer studies in streams / David E. Hibbs, Kenneth L. Parkhill and John S. Gulliver // *J. Environ. Eng.* – 1998. – Vol.124. – p. 752-760.
69. Hiraoka H. Partial molal volumes of sulfur hexafluoride / H. Hiraoka and J. H. Hildebrand // *J. Phys. Chem.* – 1963. – Vol.67. – Iss. 9. 1919.
70. Hlastala M.P. Solubility of helium, argon, and sulfur hexafluoride in human blood measured by mass spectrometry / MP Hlastala, M Meyer, G Riepl, P.Scheid. // *Undersea Biomed Res.* – 1980 – Vol.7. – Iss.4 – p. 297-304.
71. Hoppesch J. P.. Picogram detection of sulfur hexafluoride by high pressure charge exchange mass spectrometry / J. P. Hoppesch and R. C. Domingo // *Analytical letters*. – 1975. – Vol. 8. – Iss.11. – p. 839-848.
72. Morel D.R. Human pharmacokinetics and safety evaluation of SonoVue, a new contrast agent for ultrasound imaging / Morel D.R., Schwieger I., Hohn L., Terreraz J., Llull J.B., Cornioley Y.A., Schneider M. // *Invest Radiol.* – 2000. – Vol.35. – Iss.1. – p. 80-85.
73. Klocke F.J., Measurement of cardiac output using improved chromatographic analysis of sulfur hexafluoride (SF₆) / Francis J. Klocke, Douglas L. Roberts, Eli R. Farhi // *Respiration physiology* – 1977 – Vol. 30 p. 99-107.

74. Ko M. K. W. Atmospheric Sulphur hexafluoride: sources, sinks and greenhouse warming/ Sze N. D., Wang W. C., Shia G., Goldman A., Murcray F. J., Murcray D. G., Rinsland C. P // J. Geophys. Res. – 1993. – Vol.98. – p. 10499-10507.
75. Koreh O. Study of decomposition of sulphur hexafluoride by gas chromatography/mass spectrometry / Orsolya Kóréh, Tamás Rikker, Gábor Molnár, Bashir Mohamed Mahara, Kornél Torkos, József Borossay // Rapid communications in mass spectrometry. – 1997. – №11. – p. 1643-1648.
76. Lagemann R. T. The infrared spectrum of sulfur hexafluoride / R. T. Lagemann and E. A. Jones // J. of chemical physics. – 1951. – Vol. 19. – p. 534-536.
77. Laurens J.B. Gas chromatographic analysis of trace gas impurities in tungsten hexafluoride / Johannes Bernardus Laurens, Johannes Petrus de Coning and John McNeil Swinley // J. of chromatography. – 2001. – Vol.911. – p. 107-112.
78. Levy J.M. The effects of modifiers in supercritical fluid chromatography / Levy J.M., Ritchey W.M. // J High Resolut Chrom Chrom Comm. – 1985. – Vol. 8. – p. 503-509.
79. Levy J.M. Investigations of the uses of modifiers in supercritical fluid chromatography / Levy J.M., Ritchey W.M. // J. Chromatogr. Sci. – 1986.- Vol. 24. – p.242-248.
80. Maiss M. Sulfur hexafluoride – a powerful new atmospheric tracer / Manfred Maiss, L. Paul Steele, Roger J. Francey // Atmospheric environmental. – 1996. – Vol. 30 – p. 1621-1629.
81. Mastovska K. Optimization and evaluation of low-pressure gas chromatography–mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in a food commodity /K. Mastovska, S.J. Lehotay, J. Hajslova // J. Chromatogr. A. – 2001. – Vol. 926. – Iss. 2. – p. 291-308.
82. May M. Jet expansion module for liquid-sampled GC-discharge ionization detection of liquefied gases / Machael May, Todd Poeppelmeier and John Kuo // Ana. Chem. – 2005. – Vol. 75. – p. 1221-1224.
83. Maiss M. Atmospheric SF₆: trends, sources and prospects. / Maiss M., Brenninkmeijer C.A //Environ. Sci. Technol. – 1998. – Vol. 32 – p. 3077-3088.

84. Mitchell W.K. Development of a new Sonovue contrast-enhanced ultrasound approach reveals temporal and age-related features of muscle microvascular responses to feeding / William Kyle Mitchell, Bethan E. Phillips, John P. Williams et al. // *Physiological Reports* – 2013 – №1 – p. 1-14
85. Noy T. Trace analysis of halogenated hydrocarbons in gaseous samples by on-line enrichment in an adsorption trap, on-column cold-trapping and capillary gas chromatography / T. Noy, P. Fabian, R. Borchers et al. // *J. of Chromatography*. – 1987. – Vol. 393. – p. 343-356.
86. Occupational Toxicants and MAK Values / German Research Foundation (DFG), John Wiley & Sons, New York, USA, 2002.
87. Odoul M. Specific determination of cyanide in blood by headspace gas chromatography / M. Odoul, B. Fouillet, B. Nouri et al. // *J. of analytical toxicology* – 1994 – Vol.18 – p. 205-207.
88. Olthoff J.K. Detection of trace disulfurdecafluoride in sulfur hexafluoride by gas chromatography/mass spectrometry / James K. Olthoff, Richard J. Van Brunt, John T. Herron et al. // *Anal. chem.* – 1991. – Vol. 63 – p. 726-732.
89. Padma D. K. Vasudeva thermal decomposition of sulphur hexafluoride / D. K. Padma and A. R. Vasudeva Murthy // *J. of fluorine chemistry* – 1975 – Vol. 5 – p. 181-184.
90. Park T. Solubility of gases in liquids. 14. Bunsen coefficients for several fluorine-containing gases (freons) dissolved in water at 298.15 K / Tracy Park, Timothy R. Rettich, Rublin Battino et al. // *J. Chem. Eng.* – 1982 – Vol. 27 – p. 324-326.
91. Patel K. Evaluation of gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils / K. Patel, R.J. Fussell, M. Hetmanski, D.M. Goodall, B.J. Keely, // *J. Chromatogr. A*. – 2005. – Vol. 1068. – p. 289-296.
92. Permissible Concentration Standards of AIR Toxics at Workplace Environment (in Chinese) / Council of Labor (COLA), COLA, Taipei, Taiwan, 2003.
93. Petrus de Coning J. Optimisation of a gas chromatographic method for trace gaseous impurities in nitrogen trifluoride by column sequence reversal / J. Petrus

de Coning and J. McNeil Swinley // J. of chromatography. – 2008 – Vol. 1180 – p. 151-158.

94. Rinsland C. P. Infrared Spectroscopic Detection of Sulfur Hexafluoride (SF_6) in the Lower Stratosphere and Upper Troposphere / C. P. Rinsland, L. R. Brown and C. B. Farmer // Journal of Geophysical Research. – 1990. – Vol. 95. – p. 5577-5585.

95. Safety and Health Topics: Permissible Exposure Limits(PELs) / Occupational Safety and Health Administration (OSHA), 2003, available: <http://www.osha.gov/SLTC/pel/index.html> (accessed 8 February 2007).

96. Sammens J. Upper critical solution temperatures of mixtures containing sulphur hexafluoride/ J. Sammens, S. D. Waterson, C. L. Young // Fluid Phase Equilibria. – 1982. – Vol. 8. – Iss. 3. – p. 309-314.

97. Schladow S.G. Use of tracers to quantify subsurface flow through a mining pit / S. Geoffrey Schladow and Jordan F. Clark // Ecological Applications – 2008 – Vol. 18. – Iss. 8 – p. 55-71.

98. Schumb W.C. The preparation of sulfur hexafluoride and some of its physical properties / Walter C. Schumb and E. Lee Gamble // J. Am. Chem. Soc. – 1930. – Vol. 52 – p. 4302-4308.

99. Simmonds P. G. Improvements in the determination of sulfur hexafluoride for use as a meteorological tracer / P. G. Simmonds, G. R. Shoemaker and J. E. Lovelock // Analytical chemistry – 1972 – Vol. 4. – p. 860-863.

100. SULFUR HEXAFLUORIDE by portable GC: method 5512 // Pub. by The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). – Issue 2, dated 15 August 1994.

101. Tomonaga Y. An improved method for the analysis of dissolved noble gases in the pore water of unconsolidated sediments / Tomonaga Y, Brennwald MS, Kipfer R // Limnol Oceanogr Methods. – 2011. – Vol. 9: – PP. 42–49.

102. Tomonaga Y. Determination of natural *in vivo* noble-gas concentrations in human blood / Yama Tomonaga, Matthias S. Brennwald, David M. Livingstone et al. // Plos one – 2014. – №9. – p. 1-8.

103. Tsai W.-T. The decomposition products of sulfur hexafluoride (SF_6): reviews of environmental and health risk analysis / Wen-Tien Tsai // J. of fluorine chemistry. – 2007. – Vol.128 – p. 1345-1352.
104. Turk A. Sulfur hexafluoride as a gas-air tracer / Amos Turk, Sylvan M. Edmonds and Howard L. Mark // Environmental Science and Technology. – 1968. – Vol.2. – Iss.1 – p. 44-48.
105. Uran S. Respiration-metabolism chamber system and a GC-MS method developed for studying exhalation of perfluorobutane in rats after intravenous injection of the ultrasound contrast agent SonazoidTM / Uran S., Landmark K., Normann P., Hals P.A., Toft K.G., Skotland T. A. // J. Pharm Biomed Anal. – 2005. – Vol. 39. – p. 746 – 751.
106. Veuthey J.L. Comparative supercritical-fluid chromatographic properties of carbon dioxide and sulfur hexafluoride-ammonia mixtures with packed columns / J. L.Veuthey, J. L. Janicot, M. Caude et al. // J. of chromatography. – 1990. – Vol. 499 – p. 637-643.
107. Wei K. Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of microbubbles administered as a constant venous infusion / Kevin Wei, Ananda R. Jayaweera, SorooshFiroozan et al. // Basic science reports. – 1997. – Vol. 97. – Iss. 5 – p. 473-483.
108. Zhuang X.-Sh. A novel gas chromatography with a pulsed discharge helium ionization detector for measurements of sulfur hexafluoride gas sampled from electrical equipment / Xian-Sheng Zhuang and Li Wu // Asia-Pacific Power and Energy Engineering Conference. – 2012. p. 1-3.
109. Zoccolillo L. Rapid gas chromatographic determination of sulfur hexafluoride in air / L. Zoccolillo, A. Liberti // J. of chromatography. – 1975. – Vol. 108. – p. 219-221.

Приложение А

Заключение об экспертизе методики

Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения
ГОЛОВНОЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ
(ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России)

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач

С.А. Богдан



« » 20 г.

М.П.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам метрологической экспертизы методик выполнения измерений регламентированной «Методика (метод) измерений молярной концентрации гексафторида серы в пробах крови методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии», разработанной в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России) Кривошековым С.В.

Экспертиза проведена на основании письма № 162 от 14.05.2018г.

номер письма (договора).

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский томский политехнический университет

организация, представившая документы на экспертизу

Методика предназначена для применения в сферах распространения государственного метрологического контроля и надзора.

Выводы о соответствии МКХА требованиям ГОСТ Р 8.563-2009 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений»:

а) Наименования измеряемых величин и обозначения их соответствуют требованиям ГОСТ 8.417-2002 «Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин».

б) Выбор средств измерений удовлетворяет условиям измерительной задачи и может быть признан рациональным.

Типы выбранных средств измерений, в том числе стандартных образцов, утверждены Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии.

в) Диапазон измерений соответствует поставленной задаче и способствует получению информации необходимой для оценки доклинические исследования безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов в соответствии с требованиями изложенными в нормативных документах Министерства здравоохранения Российской Федерации.

г) Характеристики погрешности (показатели точности) измерений соответствуют требованиям Приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации (Минздрав России) от 21 февраля 2014 г. № 81н. Об утверждении Перечня измерений, относящихся к сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений, выполняемых при осуществлении деятельности в области здравоохранения, и

Приложение Б

Расчет внутрилабораторной прецизионности методики определения гексафторида серы

Результаты расчета внутрилабораторной прецизионности приведены в таблицах 1 – 5.

Таблица 1 – Расчет на уровне концентрации 0,06 мкмоль/дм³

С _{теор} , мкмоль/дм ³	Погрешн, мкмоль/дм ³	N серии, L=15	Рез-ты парал опред		С _{ср}	S ²	G _{расч}	G _{таб} л	σ _{R л} [*]
			C ₁	C ₂					
0,06	0,0026	1	0,068	0,078	0,073	5,12×10 ⁻⁵	0,33	0,47	0,009
		2	0,058	0,066	0,062	3,2×10 ⁻⁵			
		3	0,054	0,058	0,056	8×10 ⁻⁶			
		4	0,056	0,054	0,055	0,2×10 ⁻⁵			
		5	0,073	0,047	0,060	33,5×10 ⁻⁵			
		6	0,078	0,068	0,073	5×10 ⁻⁵			
		7	0,053	0,069	0,061	12,2×10 ⁻⁵			
		8	0,068	0,056	0,062	7,2×10 ⁻⁵			
		9	0,061	0,054	0,058	2,5×10 ⁻⁵			
		10	0,060	0,068	0,064	3,2×10 ⁻⁵			
		11	0,076	0,068	0,072	3,2×10 ⁻⁵			
		12	0,052	0,066	0,059	9,9×10 ⁻⁵			
		13	0,078	0,063	0,070	11,6×10 ⁻⁵			
		14	0,054	0,061	0,058	2,7×10 ⁻⁵			
		15	0,068	0,075	0,071	2,3×10 ⁻⁵			

Таблица 2 – Расчет на уровне концентрации 0,09 мкмоль/дм³

С _{теор} , мкмоль/д м ³	Погрешн, мкмоль/дм ³	N серии, L=15	Рез-ты парал опред		С _{ср}	S ²	G _{расч}	G _{табл}	σ _{R л} *
			C ₁	C ₂					
0,09	0,0039	1	0,085	0,108	0,097	26,5×10 ⁻⁵	0,152	0,471	0,011
		2	0,109	0,099	0,104	5×10 ⁻⁵			
		3	0,100	0,094	0,097	1,8×10 ⁻⁵			
		4	0,093	0,105	0,099	7,2×10 ⁻⁵			
		5	0,113	0,089	0,101	28,6×10 ⁻⁵			
		6	0,091	0,109	0,100	16,2×10 ⁻⁵			
		7	0,097	0,121	0,109	28,8×10 ⁻⁵			
		8	0,105	0,091	0,098	9,8×10 ⁻⁵			
		9	0,111	0,102	0,107	4,05×10 ⁻⁵			
		10	0,081	0,096	0,089	11,3×10 ⁻⁵			
		11	0,119	0,101	0,110	16,2×10 ⁻⁵			
		12	0,105	0,089	0,097	12,6×10 ⁻⁵			
		13	0,095	0,093	0,094	0,2×10 ⁻⁵			
		14	0,090	0,083	0,087	2,45×10 ⁻⁵			
		15	0,091	0,099	0,095	3,2×10 ⁻⁵			

Таблица 3 – Расчет на уровне концентрации 0,12 мкмоль/дм³

С _{теор} , мкмоль/д м ³	Погрешн, мкмоль/дм ³	N серии, L=15	Рез-ты парал опред		С _{ср}	S ²	G _{расч}	G _{табл}	σ _{R л} *
			C ₁	C ₂					
0,12	0,0053	1	0,131	0,113	0,122	16,2×10 ⁻⁵	0,110	0,471	0,013
		2	0,122	0,108	0,115	9,8×10 ⁻⁵			
		3	0,125	0,131	0,128	1,8×10 ⁻⁵			
		4	0,141	0,134	0,138	2,45×10 ⁻⁵			
		5	0,109	0,118	0,114	4,05×10 ⁻⁵			
		6	0,119	0,147	0,133	39,2×10 ⁻⁵			
		7	0,141	0,132	0,137	4,05×10 ⁻⁵			
		8	0,118	0,135	0,127	14,1×10 ⁻⁵			
		9	0,121	0,136	0,129	11,3×10 ⁻⁵			
		10	0,112	0,133	0,123	22,1×10 ⁻⁵			
		11	0,108	0,129	0,119	22,1×10 ⁻⁵			
		12	0,119	0,142	0,131	26,3×10 ⁻⁵			
		13	0,132	0,124	0,128	3,2×10 ⁻⁵			
		14	0,106	0,141	0,124	61,3×10 ⁻⁵			
		15	0,143	0,149	0,146	1,8×10 ⁻⁵			

Таблица 4 – Расчет на уровне концентрации 1,5 мкмоль/дм³

C _{теор} , мкмоль/дм ³	Погрешн, мкмоль/дм ³	N серии, L=15	Рез-ты парал опред		C _{ср}	S ²	G _{расч}	G _{табл}	σ _{Rл} *
			C ₁	C ₂					
1,5	0,066	1	1,43	1,50	1,47	0,0025	0,1 52	0,4 71	0,1 2
		2	1,39	1,51	1,45	0,0072			
		3	1,39	1,31	1,35	0,0032			
		4	1,59	1,34	1,47	0,0313			
		5	1,46	1,59	1,53	0,0085			
		6	1,44	1,55	1,50	0,0061			
		7	1,63	1,41	1,52	0,0242			
		8	1,37	1,48	1,43	0,0061			
		9	1,41	1,63	1,52	0,0242			
		10	1,24	1,39	1,32	0,0113			
		11	1,67	1,34	1,51	0,0545			
		12	1,49	1,42	1,46	0,0025			
		13	1,39	1,56	1,48	0,0145			
		14	1,46	1,53	1,50	0,0025			
		15	1,61	1,49	1,55	0,0072			

Таблица 5 – Расчет на уровне концентрации 15 мкмоль/дм³

C _{теор} , мкмоль/дм ³	Погрешн, мкмоль/дм ³	N серии, L=15	Рез-ты парал опред		C _{ср}	S ²	G _{расч}	G _{табл}	σ _{Rл} *
			C ₁	C ₂					
15	0,65	1	15,65	14,36	15,00	0,83	0,191	0,4 71	0,9
		2	14,84	15,72	15,28	0,39			
		3	15,62	14,19	14,90	1,02			
		4	14,76	13,86	14,31	0,41			
		5	15,64	15,12	15,38	0,13			
		6	14,82	14,19	14,50	0,20			
		7	14,56	13,35	13,95	0,73			
		8	15,84	14,12	14,98	1,47			
		9	14,97	13,95	14,46	0,53			
		10	14,56	13,86	14,21	0,25			
		11	13,84	15,82	14,83	1,97			
		12	14,62	13,99	14,30	0,20			
		13	14,56	13,46	14,01	0,61			
		14	15,84	14,32	15,08	1,15			
		15	15,18	14,19	14,68	0,48			