

О валидации модифицированного метода внутреннего стандарта определения количественного содержания летучих компонентов в алкогольной продукции

Введение

На 66-ой сессии Генассамблеи Международной межправительственной организации виноградарства и виноделия (МОВВ) в сентября 2023 года принято решение включить проект СИ-SCMA 2023-09 06 (Method for determination of volatile compounds in spirituous beverages of vitivincultural origin using contained ethanol as a reference substance) в план МОВВ разработки международного стандарта на основе предложенного метода. Одним из этапов предусматривается подготовка и проведение валидации предложенного метода во многих испытательных лабораториях по контролю качества и безопасности алкогольной продукции. С целью обеспечения высокой эффективности валидации метода, устранения материальных, финансовых, трудовых и временных затрат при ее выполнении, предложен алгоритм получения результатов валидации метода на основе перерасчета уже имеющихся экспериментальных данных, полученных в лаборатории при проведении испытаний алкогольной продукции в соответствии с действующими стандартизованными методами.

Газовые хроматографы (ГХ) фирмы Hewlett-Packard (Agilent) являются наиболее распространенными по всему миру для количественного определения летучих компонентов в алкогольной продукции. В том числе, в Беларуси все производственные лаборатории ликероводочных заводов холдинга ОАО МИНСК КРИСТАЛЛ (Гродненский, Брестский, Гомельский, Могилевский, Витебский и Минский ЛВЗ), а также производственные лаборатории Аквадив, Бульбашь, Пинский ВВЗ “Кальвадос”, Поречье, Мир, Алгонь и т.д. оснащены хроматографами именно этого мирового производителя. В работе представлен подготовленный проект алгоритма эффективной валидации метода на ГХ Agilent, оснащенных программным обеспечением ChemStation.

Теоретические основы метода внешнего стандарта, традиционного метода внутреннего стандарта и модифицированного метода внутреннего стандарта

Установление калибровочных коэффициентов

В случае применения для количественных расчетов метода внешнего стандарта (абсолютная градуировка) градуировочная характеристика измерительного прибора заключается в установлении значения коэффициента отклика детектора на i -ый летучий компонент RF_i (Response Factor – RF), устанавливаются методом одноточечной калибровки по результатам измерений стандартного водно-этанольного раствора (Water Ethanol Solution – далее WES) с объемным содержанием этилового спирта 40 % и с известной концентрацией i -го исследуемого летучего компонента по следующей формуле

$$RF_i = \frac{\sum_{j,k=1}^{M,N} \tilde{C}_{ij}^{WES} \cdot A_{ijk}^{WES}}{\sum_{j,k=1}^{M,N} (A_{ijk}^{WES})^2}, \quad (1)$$

где \tilde{C}_{ij}^{WES} – значение концентрации i -го летучего компонента в j -ом стандартном растворе, выраженное в мг/л; A_{ijk}^{WES} – величина отклика детектора на i -ый исследуемый летучий компонент, выраженная в единицах площади пика, полученная в результате k -го измерения j -го стандартного раствора WES $_j$; M – количество измерений j -го стандартного раствора WES $_j$, N – количество стандартных растворов WES, использованных при установлении калибровочных коэффициентов. Коэффициенты RF_i в данном случае не являются безразмерными величинами и имеют размерность (мг/л)/(площадь пика).

Коэффициента детерминации \tilde{R}_i^2 определяют по следующей формуле

$$\tilde{R}_i^2 = 1 - \frac{\sum_l^S (\tilde{C}_{il}^{WES} - RF_i \cdot A_{il}^{WES})^2}{\sum_l^S (\tilde{C}_{il}^{WES} - \frac{1}{S} \sum_l^S \tilde{C}_{il}^{WES})^2}, \quad (2)$$

где S – суммарное количество всех измеренных хроматограмм стандартных растворов.

В случае применения для количественных расчетов традиционного метода внутреннего стандарта градуировочная характеристика измерительного прибора заключается в установлении значения относительного коэффициента отклика детектора (Relative Response Factor – RRF) на i -ый исследуемый летучий компонент относительно отклика детектора на вещество внутреннего стандарта (Internal Standard – IS) RRF_i^{IS} . Значение коэффициента рассчитывают методом одноточечной калибровки по результатам измерений стандартного водно-этанольного раствора WES_{calibr} с объемным содержанием этилового спирта 40 % и с известной концентрацией i -го исследуемого летучего компонента по следующей формуле

$$RRF_i^{IS} = \frac{\sum_{k=1}^M (\tilde{C}_{i\ calibr}^{WES} / \tilde{C}_{IS\ calibr}^{WES}) \cdot (A_{i\ calibr\ k}^{WES} / A_{IS\ calibr\ k}^{WES})}{\sum_{k=1}^M (A_{i\ calibr\ k}^{WES} / A_{IS\ calibr\ k}^{WES})^2}, \quad (3)$$

где $\tilde{C}_{i\ calibr}^{WES}$ и $\tilde{C}_{IS\ calibr}^{WES}$ значения концентрации i -го исследуемого летучего компонента и вещества внутреннего стандарта, соответственно, в стандартном растворе WES_{calibr} , используемом при установлении калибровочных коэффициентов, выраженные в мкг/г; $A_{этанол\ calibr\ k}^{WES}$ и $A_{i\ calibr\ k}^{WES}$ величины отклика детектора на вещество внутреннего стандарта и на i -ый исследуемый летучий компонент, соответственно, выраженные в единицах площади пика, полученные в результате k -го измерения стандартного раствора WES_{calibr} ; M – количество измерений калибровочного стандартного раствора WES_{calibr} . Важно отметить, что в данном случае коэффициенты RRF_i^{IS} являются безразмерными величинами.

Расчеты коэффициента детерминации \tilde{R}_i^2 выполняют по следующей формуле

$$\tilde{R}_i^2 = 1 - \frac{\sum_l^S (\tilde{C}_{i,l \text{ calibr}}^{WES} - RRF_i^{IS} \cdot \tilde{C}_{IS,l \text{ calibr}}^{WES} \cdot A_{i,l}^{WES} / A_{IS \text{ calibr } 1}^{WES})^2}{\sum_l^S (\tilde{C}_{i,l \text{ calibr}}^{WES} - \frac{1}{S} \sum_k^S \tilde{C}_{i,k \text{ calibr}}^{WES})^2} \quad (4).$$

В случае применения для количественных расчетов модифицированного метода внутреннего стандарта с использованием этилового спирта, присутствующего в испытуемом образце, в качестве референсного вещества, градуировочная характеристика измерительного прибора заключается в установлении значения относительного коэффициента отклика детектора (Relative Response Factor – RRF) на i -ый исследуемый летучий компонент относительно отклика детектора на этанол $RRF_i^{\text{этанол}}$. Значение коэффициента рассчитывают методом одноточечной калибровки по результатам измерений стандартного водно-этанольного раствора WES_{calibr} с объемным содержанием этилового спирта 40 % и с известной концентрацией i -го исследуемого летучего компонента по следующей формуле

$$RRF_i^{\text{этанол}} = \frac{\sum_{k=1}^M C_{i \text{ calibr}}^{WES} \cdot (A_{i \text{ calibr } k}^{WES} / A_{\text{этанол } \text{ calibr } k}^{WES})}{\rho_{\text{этанол}} \cdot \sum_{k=1}^M (A_{i \text{ calibr } k}^{WES} / A_{\text{этанол } \text{ calibr } k}^{WES})^2} \quad (5)$$

где $C_{i \text{ calibr}}^{WES}$ значение концентрации i -го исследуемого летучего компонента в стандартном растворе WES_{calibr} , используемом при установлении калибровочных коэффициентов, выраженное в мг/л безводного спирта (Absolute Alcohol – AA); $\rho_{\text{этанол}}$ – значение концентрации этанола в стандартном растворе WES_{calibr} , выраженное в мг/л безводного спирта (Absolute Alcohol – AA), равно табличному значению плотности безводного этанола, $\rho_{\text{этанол}} = 789270$ мг/л; $A_{\text{этанол } \text{ calibr } k}^{WES}$ и $A_{i \text{ calibr } k}^{WES}$ – величина отклика детектора на этанол и на i -ый исследуемый летучий компонент, выраженная в единицах площади пика, полученная в результате k -го измерения стандартного раствора WES_{calibr} ; M – количество измерений калибровочного стандартного раствора WES_{calibr} . Важно отметить, что в данном случае коэффициенты $RRF_i^{\text{этанол}}$ являются безразмерными величинами.

Расчеты коэффициента детерминации R_i^2 выполняют по следующей формуле

$$R_i^2 = 1 - \frac{\sum_l^S (C_{i,l}^{WES} - RRF_i \cdot \rho_{\text{этанол}} \cdot A_{i,l}^{WES} / A_{\text{этанол calibr l}}^{\text{WES}})^2}{\sum_l^S (C_{i,l}^{WES} - \frac{1}{S} \sum_k^S C_{i,k}^{WES})^2} \quad (6)$$

Установление концентрации летучих компонентов в образце

В случае применения для количественных расчетов метода внешнего стандарта концентрацию летучих компонентов, выраженную в мг/л, в испытуемом образце рассчитывают по следующей формуле,

$$\tilde{C}_i [\text{мг/л}] = RRF_i \cdot A_i \quad (7)$$

где A_i – величины отклика детектора на i -ый исследуемый летучий компонент.

В случае применения для количественных расчетов метода внутреннего стандарта концентрацию летучих компонентов, выраженную в мкг/г, в испытуемом образце рассчитывают по следующей формуле,

$$C_i [\text{мкг/г}] = RRF_i^{IS} \cdot C^{IS} \cdot \frac{A_i}{A_{IS}} \quad (8)$$

где C_{IS} – величина концентрации вещества внутреннего стандарта в испытуемом образце в размерности мкг/г; A_i и A_{IS} – величина отклика детектора на i -ый исследуемый летучий компонент и на вещество внутреннего стандарта, соответственно, выраженная в единицах площади пика.

В случае применения для количественных расчетов модифицированного метода внутреннего стандарта с использованием этилового спирта, присутствующего в испытуемом образце, в качестве референсного вещества, концентрацию летучих компонентов, выраженную в мг/л АА, в испытуемом образце рассчитывают по следующей формуле,

$$C_i [\text{мг/л АА}] = RRF_i^{\text{этанол}} \cdot \rho_{\text{этанол}} \cdot \frac{A_i}{A_{\text{этанол}}} \quad (9)$$

где A_i и $A_{\text{этанол}}$ – величина отклика детектора на i -ый исследуемый летучий компонент и на этанол, соответственно, выраженная в единицах площади пика.

Из анализа формулы (9) следует, что концентрация i -го исследуемого летучего компонента, равна в точности табличному значению плотности

этанола, умноженному на величину отношения скорректированного отклика детектора на исследуемый i -ый летучий компонент к отклику детектора на этанол. Как следствие, формула (9) может быть представлена в следующем простом виде

$$C_i = 789270 \cdot \frac{RRF_i^{\text{этанол}} \cdot A_i}{A_{\text{этанол}}} \quad (10)$$

Концентрация метилового спирта, выраженная в объемных процентах % (v/v) и в объемных процентах в пересчете на безводный спирт (этиловый), может быть пересчитана по следующей формуле

$$C_{\text{метанол}} [\%, v/v] = C_{\text{метанол}} [\text{мг/л}] / \rho_{\text{метанол}} [\text{мг/л}] \cdot 100\%, \quad (11)$$

$$C_{\text{метанол}} [\%, v/v \text{ AA}] = C_{\text{метанол}} [\text{мг/л AA}] / \rho_{\text{метанол}} [\text{мг/л}] \cdot 100\%, \quad (12)$$

где $\rho_{\text{этанол}} = 792000$ мг/л.

Контроль правильности полученных результатов

Контроль правильности результатов, полученных для модельных растворов, считают приемлемой в случае, когда выполняется условие

$$\delta_i \leq K_i, \quad (13)$$

где δ_i – относительное смещение полученного экспериментального значения концентрации i -го исследуемого летучего компонента в проанализированном модельном растворе или образце алкогольного продукта с добавкой, %; K_i – контрольное значение параметра для оценки относительного смещения, %.

В случае модельных растворов относительное смещение рассчитывают по формуле

$$\delta_i^i = \frac{|C_i - \mu_i|}{\mu_i} \cdot 100\%, \quad (14)$$

где C_i – концентрации i -го летучего компонента в проанализированном модельном растворе, рассчитанная по данным хроматографического измерения, мг/л безводного спирта; μ_i – известное приписанное значение концентрации i -го летучего компонента в проанализированном модельном растворе, мг/л безводного спирта.

В случае проб алкогольных и спиртосодержащих продуктов относительное смещение рассчитывают по формуле

$$\delta_i^{\text{доб}} = \frac{|\Delta C_i - \Delta \mu_i|}{\Delta \mu_i} \cdot 100 \%, \quad (15)$$

где

$$\Delta C_i = C_i^{\text{добавка}} - C_i^{\text{без добавки}}, \quad (16)$$

где ΔC_i – концентрация добавки i -го летучего компонента в образец алкогольного продукта с добавкой, мг/л безводного спирта; $\Delta \mu_i$ – известное приписанное значение концентрации добавки в образце алкогольного продукта с добавкой, мг/л безводного спирта; $C_i^{\text{добавка}}$ и $C_i^{\text{без добавки}}$ – концентрация i -го летучего компонента в образце алкогольного продукта с добавкой и без добавки, рассчитанная по данным хроматографического измерения, мг/л безводного спирта.

Оценка эффективности выполненной перегонки

Оценка эффективности выполненной перегонки выполнялась путем оценки параметра Rec , который рассчитывался по формуле

$$Rec = \frac{C_{\text{метанол}}^{\text{перегнанный}}}{C_{\text{метанол}}^{\text{исходный}}} \cdot 100 \%, \quad (17)$$

где $C_{\text{метанол}}^{\text{перегнанный}}$ и $C_{\text{метанол}}^{\text{исходный}}$ – концентрация метилового спирта в дистилляте и в исходном образце алкогольного напитка, соответственно, мг/л безводного спирта.

В случае, если значение Rec находилось в диапазоне от 95 до 105 %, перегонка алкогольного напитка признавалась эффективной.

Алгоритм работы в программном обеспечении ChemStation

Программное обеспечение современных хроматографических комплексов позволяет экспортировать полученные значения измеренных хроматограмм стандартных растворов и испытуемых образцов алкогольной продукции в широко используемые вычисляемые таблицы, например, в таблицы MS Excel. Это обстоятельство предоставляет удобную возможность выполнять расчет количественного содержания летучих компонентов с помощью модифицированного метода внутреннего стандарта на основе данных

измеренных хроматограмм при выполнении испытаний по принятым в лаборатории нормативным документам. Таким образом, на основании полученных исходных экспериментальных данных можно синхронно получать отчет выполненными испытаниями по методу внешнего стандарта или по традиционному методу внутреннего стандарта и по модифицированному методу внутреннего стандарта.

Определение величин RRF при использовании ГСО 8405-2003

Численные значения относительных коэффициентов отклика RRF рассчитывают по данным трех измеренных хроматограмм стандартного раствора с количественным содержанием исследуемых летучих компонентов как указано для стандартного раствора РВ-1 из набора ГСО 8405-2003.

Папку с размещенными в ней измеренными хроматограммами стандартных растворов РВ-3, РВ-2 и РВ-1 переименовывают в папку **C:\Chem32\1\DATA\Калибровка_по_РВ_8405-2003**.

В папку **C:\Chem32\1\DATA** размещают рабочий файл с названием **Intelligent_use_of_Ethanol_GOST.xls**.

Выполняют экспорт данных измеренных хроматограмм стандартных растворов РВ-3, РВ-2 и РВ-1 в файл формата ***.xls**. Как правило, по умолчанию этому файлу присваивается имя **REPORT01.xls** и размещается он в папке, где ранее была записана измеренная хроматограмма. При экспорте данных в файл формата ***.xls** одновременно происходит экспорт данных в файл формата ***.pdf** по умолчанию с названием папки данных измеренной хроматограммы.

Пример расположения папок измеренных хроматограмм градуировочных растворов и расположение в них экспортированных файлов приведен на Рис. 1.

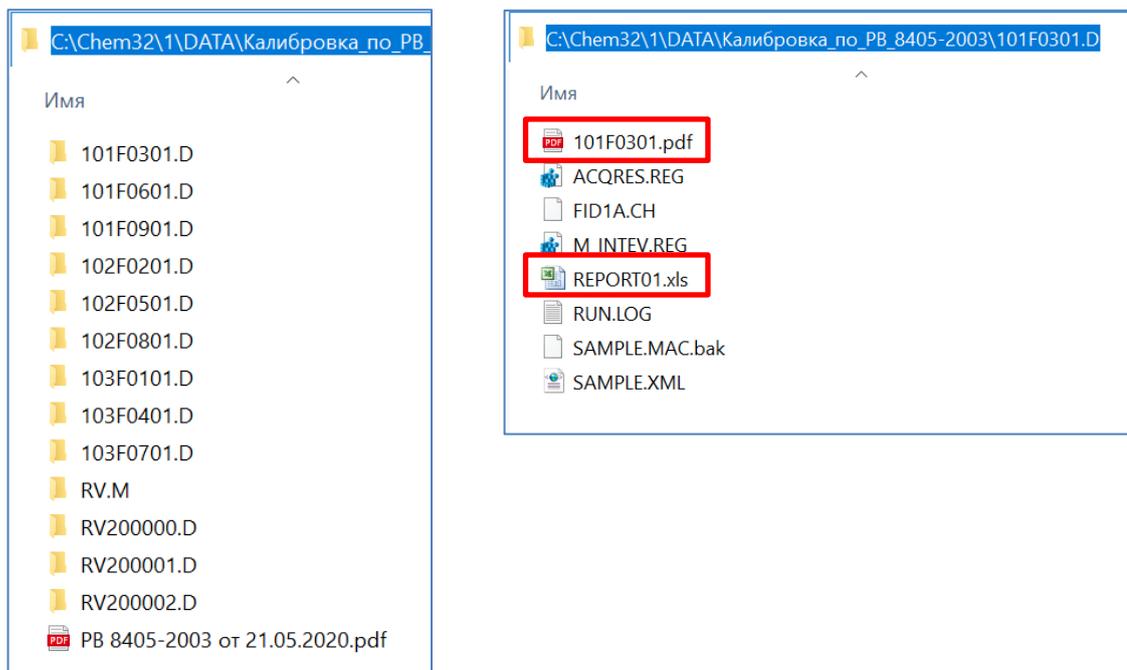


Рис. 1. Перечень измеренных по три раза хроматограмм градуировочных растворов PB-3, PB-2 и PB-1 и расположение в них экспортированных файлов, которые выделены красной рамкой.

Во всех папках переименовывают экспортированные файлы **REPORT01.xls** на названия соответствующих экспортированных отчетов с расширением **pdf**.

Для расчета относительных коэффициентов отклика RRF открывают рабочий файл с названием **Intelligent_use_of_Ethanol_GOST.xls** и экспортированные файлы с отчетами трех измеренных хроматограмм градуировочного раствора PB-1: **101F0301.xls**, **101F0601.xls** и **101F0901.xls**.

На Рис. 2 представлена экранная копия страницы “**RRF этанол**” открытой книги **Intelligent_use_of_Ethanol_GOST.xls** с результатами расчета коэффициентов RRF.

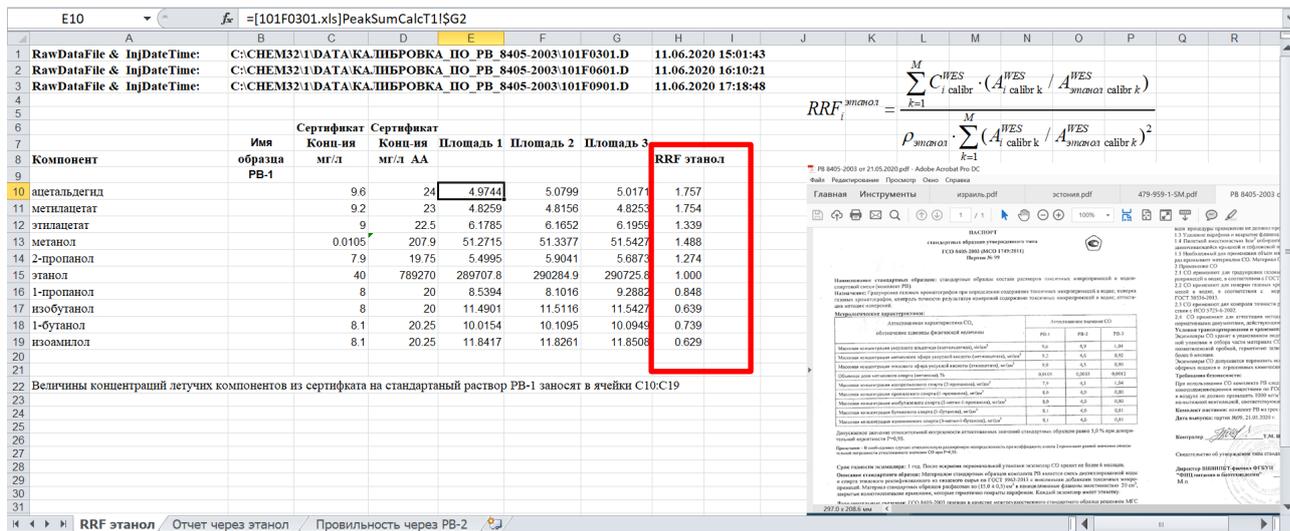


Рис. 2. Значения рассчитанных коэффициентов RRF приведены в ячейках H0:H19.

На Рис. 3 представлена экранная копия страницы “Отчет через этанол” открытой книги *Intelligent_use_of_Ethanol_GOST.xls* с результатами расчета

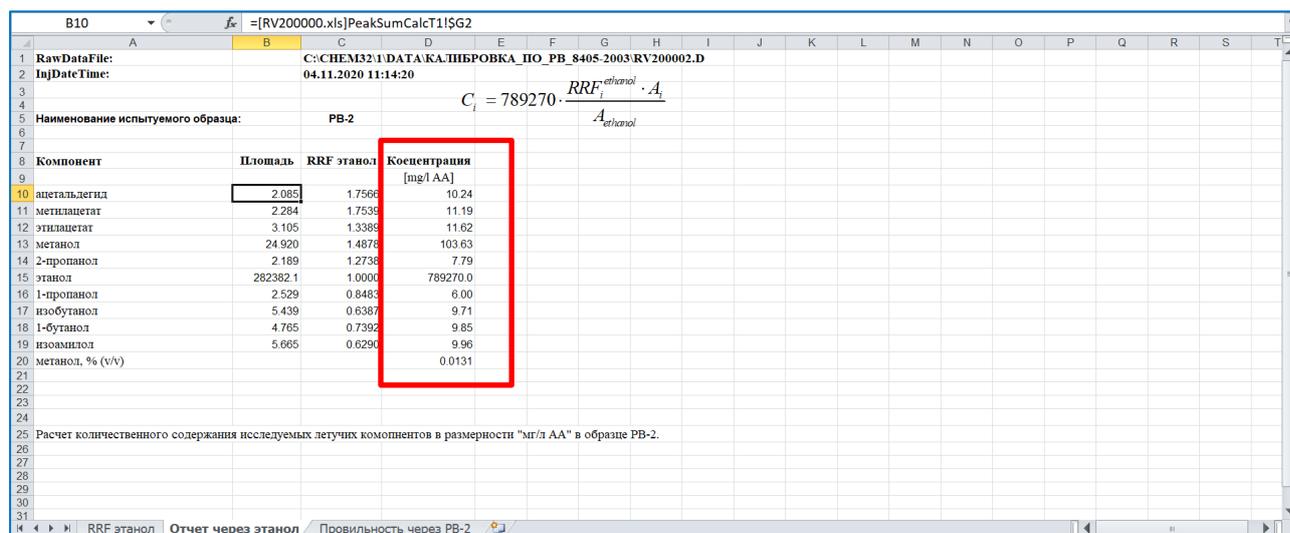


Рис. 3. Значения рассчитанных величин количественного содержания летучих компонентов в испытуемом образце PB-2 по алгоритму с использованием этанола в качестве внутреннего стандарта в размерности “мг/л АА” представлены в ячейках D10:D19.

На Рис. 4 представлена экранная копия страницы “Правильность через PB-2” открытой книги *Intelligent_use_of_Ethanol_GOST.xls* с результатами контроля правильности

выполнения измерений по алгоритму с использованием этанола в качестве внутреннего стандарта.

H10 f8 =[102F0501.xls]PeakSumCalcT1!\$G2													
		Сертификат		1-ое изм. РВ-2		2-ое изм. РВ-2		3-ее изм. РВ-2					
Компонент	RRF этанол	конц-ия [мг/л]	конц-ия [мг/л AA]	Площадь [мг/л AA]	Измеренная конц-ия [мг/л AA]	Относит. смещение, %	Площадь [мг/л AA]	Измеренная конц-ия [мг/л AA]	Относит. смещение, %	Площадь [мг/л AA]	Измеренная конц-ия [мг/л AA]	Относит. смещение, %	
10 ацетальдегид	1.7566	4.90	12.25	2.46	11.58	-5.5	2.52	12.10	-1.2	2.52	11.98	-2.1	
11 метпантат	1.7539	4.60	11.50	2.34	10.98	-4.5	2.46	11.63	1.1	2.39	11.34	-1.4	
12 этилпентат	1.3389	4.50	11.25	3.14	11.25	0.0	3.13	11.29	0.4	2.95	10.67	-5.1	
13 метанол	1.4878	0.0053	104.04	26.43	105.26	0.3	26.58	106.48	1.5	26.27	105.77	0.8	
14 2-пропанол	1.2738	4.10	10.25	2.14	7.29	-28.9	2.76	9.47	-7.6	2.34	8.08	-21.2	
15 этанол	1.0000	40	789270	294854.8	789270.0	0.0	293154.4	789270.00	0.0	291724.1	789270.00	0.0	
16 1-пропанол	0.8483	4.00	10.0	4.25	9.66	-3.4	4.49	10.26	2.6	4.30	9.87	-1.3	
17 изобутанол	0.6387	4.00	10.0	5.87	10.04	0.4	5.81	10.00	0.0	5.75	9.94	-0.6	
18 1-бутанол	0.7392	4.00	10.0	5.18	10.24	2.4	5.01	9.97	-0.3	5.15	10.31	3.1	
19 изоамилол	0.6290	4.00	10.0	6.12	10.30	3.0	6.02	10.19	1.9	5.95	10.12	1.2	
20 метанол, % (v/v)		0.0053	0.01325		0.01329	0.3		0.01344	1.5		0.01336	0.8	

Рис. 4. Значения рассчитанных величин количественного содержания летучих компонентов в испытуемом образце РВ-2 в требуемой размерности “мг/л АА” и сравнение с соответствующими значениями из сертификата на испытуемый образец. Величины рассчитанных относительных смещений обозначены красной рамкой.

**Возможные совпадения имен, фамилий, названий организаций являются чисто случайными*