

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

*Вергун О.М.*

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»*

*Минск, Беларусь*

*vom\_v@tut.by*

*Публикация посвящена описанию методов количественного определения лекарственных веществ, для чистых субстанций и в ходе химико-токсикологического исследования биологического материала, которым в учебном процессе уделяется меньшее внимание.*

**Ключевые слова:** *количественное определение лекарственных средств; метод абсолютной градуировки; метод внутреннего стандарта; метод эталонной добавки.*

## QUANTITATIVE RESEARCH METHODS USED IN PHARMACEUTICAL AND TOXICOLOGICAL CHEMISTRY

*Vergun O.M.*

*Belarusian State Medical University*

*Minsk, Belarus*

*The publication is devoted to the description of methods for the quantitative determination of medicinal substances, for pure substances and in the course of chemical-toxicological research of biological material, which are given less attention in the educational process.*

**Key words:** *quantitative determination of medicines; absolute calibration method; internal standard method; reference addition method.*

Количественный анализ — определение содержания (массы, концентрации) или количественных соотношений компонентов в анализируемом образце [1].

В задачи качественного анализа входит: установление присутствия (обнаружение, открытие) в пробе тех или иных компонентов, их идентификация и количество в пробе [2].

Деление химического анализа на качественный анализ и количественный анализ в определённой степени условно. Если компонент не обнаружен в пробе, то его содержание ниже некоторого предела, ограничиваемого используемым методом. Когда состав анализируемой пробы неизвестен, сначала проводят качественный анализ и только после этого приступают к количественным измерениям. Качественный и количественный анализ проводят химическими, инструментальными (физическими и физико-химическими) и биологическими методами [2].

**Метод абсолютной градуировки** заключается в построении графической зависимости одного из количественных параметров хроматографического пика (высоты или площади) или иного отклика любого аналитического сигнала от содержания вещества в пробе.

Зависимость площадей (высот) пиков ( $S(H)_i$ ) или иного отклика аналитического сигнала определяемых веществ от их концентраций в растворе

( $C_i$ ) выражают линейным уравнением вида  $y = bx$ , т.е. измерения проводят для концентраций веществ, которые отвечают линейному диапазону работы детектора прибора. Установление угловых коэффициентов линейных зависимостей ( $b$ ) выполняется каждый раз после установки, настройки и ремонта оборудования или после длительного перерыва в измерениях.

Установление угловых коэффициентов линейных зависимостей выполняется по методу наименьших квадратов, используя для расчёта отклики приборов, которые получают при измерении градуировочных растворов с заданными концентрациями определяемых веществ. Градуировочные растворы подвергаются исследованию в тех же условиях, что и исследуемые пробы. Количество уровней концентраций вещества – не менее 5. Для каждой концентрации определяемого вещества проводят не менее 2 измерений. Угловым коэффициентом линейной зависимости ( $y = bx$ ) вычисляется по формуле:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M C_i \cdot S(H)_i}{M \cdot \sum_{i=1}^N (C_i)^2} \quad (1), \text{ где:}$$

$N$  – количество растворов разной концентрации ( $N \geq 5$ );  $M$  – количество измерений каждого раствора ( $M \geq 2$ );  $C_i$  – концентрация определяемого вещества в  $i$ -том растворе;  $S(H)_i$  – площадь (высота) пика на хроматограмме вещества из  $i$ -го раствора.

Для полученного углового коэффициента линейной зависимости выполняется проверка коэффициента аппроксимации  $R^2$ , который определяется следующим выражением:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M (S(H)_i - b \cdot C_i)^2}{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \left( S(H)_i - \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M S(H)_i}{N \cdot M} \right)^2} \quad (2)$$

Угловым коэффициентом линейной зависимости ( $b$ ) и его коэффициентом аппроксимации ( $R^2$ ) также могут быть рассчитаны программным обеспечением оборудования или в программной среде Excel. Коэффициент аппроксимации линейной зависимости считают удовлетворительным если:  $R^2 \geq 0,990$ .

Если  $R^2$  получился менее 0,990, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, принимают меры по их устранению или переходят к использованию метода внутреннего стандарта.

Недостатки метода абсолютной калибровки: трудоемкость; точность дозирования пробы; обязательное наличие большого числа чистых исследуемых соединений; отсутствие учета влияния других компонентов, присутствующих в пробе, на параметры пика (отклика) исследуемого соединения [2,3,4].

**Метод внутреннего стандарта** основан на том, что к анализируемой

смеси добавляют определенное количество вещества, которое не входит в состав анализируемой смеси, и по своим свойствам похож на определяемое вещество. Определяется величина отношения площадей (высот) пиков компонента при хроматографии и введенного стандарта и, используя предварительно полученную зависимость отношения площадей (высот) пиков от отношения весовых количеств этих компонентов в модельной смеси, определяется содержание анализируемого компонента.

Метод внутреннего стандарта используется для более точного количественного определения веществ, поскольку уменьшает воздействие внешних условий на количественную оценку. Метод может применяться при ручном и автоматическом способах ввода проб.

Зависимость отношения площадей (высот) пиков определяемых веществ к площади (высоте) пика внутреннего стандарта ( $S(H)_i / S(H)_{cm}$ ) от отношения их концентраций в растворе ( $C_i / C_{cm}$ ) выражают линейным уравнением вида  $y = bx$  (т.е. измерения проводят для концентраций веществ, которые отвечают линейному диапазону работы детектора прибора).

Установление угловых коэффициентов линейных зависимостей выполняется по методу наименьших квадратов (как и в методе абсолютной градуировки), используя для расчета отношения площадей (высот) пиков, которые получают при измерении градуировочных растворов с заданными концентрациями определяемых веществ и внутреннего стандарта. Калибровочные растворы подвергаются хроматографическому исследованию в тех же условиях, что и исследуемые пробы. Количество уровней концентраций вещества – не менее 5. Для каждой концентрации определяемого вещества проводят не менее 2 измерений. Угловой коэффициент линейной зависимости ( $y = bx$ ) вычисляется по формуле:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \frac{C_i}{C_{cm}} \cdot \frac{S(H)_{ij}}{S(H)_{cmij}}}{M \cdot \sum_{i=1}^N \left( \frac{C_i}{C_{cm}} \right)^2} \quad (3), \text{ где:}$$

$N$  – количество растворов разной концентрации ( $N \geq 5$ );  $M$  – количество измерений каждого раствора ( $M \geq 2$ );  $C_i$  – концентрация определяемого вещества в  $i$ -том растворе;  $C_{cm}$  – концентрация стандартного вещества;  $S(H)_{ij}$  – площадь (высота) пика определяемого вещества на хроматограмме  $i$ -го раствора;  $S(H)_{cmij}$  – площадь (высота) пика стандартного вещества на хроматограмме  $j$ -го измерения  $i$ -го раствора.

Для полученного углового коэффициента линейной зависимости выполняется проверка коэффициента аппроксимации  $R^2$ , который определяется следующим выражением:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \left( \frac{S(H)_{ij}}{S(H)_{cmij}} - b \cdot \left( \frac{C_i}{C_{cm}} \right) \right)^2}{1 - \frac{\left( \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \frac{S(H)_{ij}}{S(H)_{cmij}} - \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M S(H)_{ij}}{N \cdot M} \right)^2}{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \frac{S(H)_{ij}}{S(H)_{cmij}}}} \quad (4)$$

Коэффициент аппроксимации линейной зависимости считают удовлетворительным если:  $R^2 \geq 0,990$ . Если  $R^2$  получился менее 0,990, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

Требования, предъявляемые к внутреннему стандарту: стандартное вещество должно полностью растворяться в анализируемой смеси; стандартное вещество должно быть близким по физико-химическим свойствам с анализируемым веществом; параметры пика (отклика) определяемого вещества и стандартного вещества должны быть близкими (не отличаться более чем в десять раз); время элюирования внутреннего стандарта должно быть близким ко времени элюирования определяемого вещества.

Преимущества внутреннего стандарта: нет необходимости дозирования строго заданных количеств пробы и соблюдения постоянства всех параметров хроматографирования; возможность в каждом проводимом определении контролировать потери аналитов в процессе подготовки пробы.

Недостатки: процедуры взятия дополнительных навесок и перемешивания – источник дополнительных погрешностей; трудности при выборе стандарта [2,3,4].

**Метод эталонной добавки с внутренним стандартом** используется главным образом при анализе объектов, имеющих сложный химический и фазовый состав, в которых поведение исследуемого аналита (вещества) определяется преимущественно характеристиками самого объекта (матрицы), его способностью к поддержанию различного рода побочных процессов (комплексообразование, сорбция, солевой эффект и т.п.). Из-за протекания этих процессов, результат анализа может определяться составом матрицы в гораздо большей степени, чем содержанием в ней аналита (два объекта с одинаковым содержанием аналита, но разным составом матрицы, могут давать аналитические сигналы совершенно разной величины).

Метод эталонной добавки, позволяющий учесть влияние матрицы, заключается в том, что к анализируемой смеси несколько раз добавляют различные известные количества того компонента (в чистом виде), содержание которого следует определить. По полученным данным строится график зависимости площади (высоты) пика от величины добавки. Содержание компонента в исходной анализируемой смеси соответствует величине площади (высоты), определяемой экстраполяцией на нулевую добавку.

Основная цель метода эталонных добавок – обеспечение максимально точного соответствия условий градуировки и собственно определения. При использовании данного метода эти две операции совмещаются. Необходимым условием при этом является постоянство матричного эффекта при изменении концентрации аналита, т.е. при внесении добавки влияние матричного эффекта

и линейность детектора не должны нарушаться (если количество добавки значительно превышает количество аналита в пробе, то результат анализа приобретает большую случайную ошибку и повышается вероятность систематической ошибки).

**Заключение.** Предлагаемые методические рекомендации позволят эксперту сократить сроки выполнения исследования за счет экономии времени на поиск какой-либо дополнительной специальной литературы и информации по использованию методов количественного определения, поскольку в них подробно описаны основные методы количественного определения, применительно к любому аналитическому оборудованию.

### **Список литературы**

1. СТБ ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений, ч.1-6.
2. Винарский В.А. Хроматография [Электронный ресурс]: Курс лекций в двух частях: Часть 1. Газовая хроматография. — Электрон. текст. дан. (4,1 Мб). — Мн.: Научно-методический центр “Электронная книга БГУ”, 2003. – Режим доступа:<http://anubis.bsu.by/publications/elresources/Chemistry/vinarski.pdf> — Электрон. версия печ. публикации, 2002. – PDF формат, версия 1.4. – № гос. регистрации 1200300210.
3. Количественный газохроматографический анализ: Методические указания к выполнению лабораторной работы по курсу физико-химических методов анализа. / Сост. Апраксин В.Ф. — СПб.: СПХФА, 1999. — 12 с.
4. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. — М.: Мир, 1989. — 608 с.