

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРАКТИКЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Публикация посвящена описанию подходов для количественной оценки наличия лекарственных веществ в различных растворах. Количественные методы анализа в химии выражены последовательностью экспериментальных способов, которые определяют в образце материала, что исследуется, содержание (концентрация) отдельных составляющих и примесей.

Ключевые слова: методы: абсолютной градуировки; внутреннего стандарта; эталонной добавки с внутренним стандартом.

METHODOLOGICAL APPROACHES FOR QUANTITATIVE ASSESSMENT OF DRUGS IN THE PRACTICE OF PHARMACEUTICAL ANALYSIS

The publication is devoted to describing approaches for quantitative assessment of the presence of medicinal substances in various solutions. Quantitative methods of analysis in chemistry are expressed as a sequence of experimental methods that determine in a sample of the material that is being studied, the content (concentration) of individual components and impurities.

Keywords: methods: absolute calibration; internal standard; reference additive with internal standard.

Количественный анализ — это раздел аналитической химии, который занимается определением компонентов тестируемого соединения или смеси. [1]. Методы, используемые в этом виде анализа, можно разделить на две основные группы: классические и инструментальные. В случае классических методов, также известных как химические, требуются различные реакции, и определение выполняется с использованием масс или объемов. Инструментальные ме-

тоды позволяют использовать измерительные приборы, использующие зависимость различных физических и химических величин от концентрации анализируемого вещества.

В задачи качественного анализа входит: установление присутствия (обнаружение, открытие) в пробе тех или иных компонентов (лекарственных средств, наркотических или психотропных веществ), оценка их количественного содержания в образце [2].

Деление химического анализа на качественный анализ и количественный анализ в определенной 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) или биологическими методами [2].

Метод абсолютной градуировки заключается в построении графической зависимости одного из количественных параметров любого отклика аналитического сигнала от содержания вещества в пробе.

Зависимость 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 прибора). Установление угловых коэффициентов линейных зависимостей (b) выполняется каждый раз после установки, настройки и ремонта оборудования или после длительного перерыва в измерениях (более 1 месяца).

Установление угловых коэффициентов линейных зависимостей выполняется по методу наименьших квадратов, используя для расчета 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. Угловой коэффициент линейной зависимости ($y=bx$) вычисляется по формуле 1:

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

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;

$S(H)_i$ — показания анализатора для вещества из i -го раствора.

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

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

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 (там, где это возможно). Угловой коэффициент линейной зависимости (b) и его коэффициент аппроксимации (R^2) также могут быть

рассчитаны программным обеспечением оборудования или в среде EXCEL.

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.

Метод внутреннего стандарта основан на том, что к анализируемой смеси добавляют определенное количество вещества, которое не входит в состав анализируемой смеси, близкого по физико-химическим свойствам к определяемым веществам и параметры которого не перекрывается ни с одним из исследуемых компонентов. Определяется величина отношения показателей анализатора исследуемого компонента и введенного стандарта. Предварительно рассчитывается и строится график отношений аналитических сигналов различных концентраций искомого вещества к аналитическому сигналу внутреннего стандарта. Для расчета концентрации анализируемого компонента используется предварительно полученная градуировочная зависимость.

Зависимость отношения аналитических сигналов определяемых веществ к аналитическому сигналу 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 прибора). Установление угловых коэффициентов линейных зависимостей (b) выполняется каждый раз после установки, настройки и ремонта прибора или после длительного перерыва в измерениях (более 1 месяца), а также в случае, когда результат контроля качества процедуры измерений признан неудовлетворительным.

Установление угловых коэффициентов линейных зависимостей выполняется по методу наименьших квадратов, используя для расчета отношения площадей (высот) пиков, которые получают при измерении градуировочных растворов с заданными концентрациями определяемых веществ и внутреннего стандарта. Калибровочные 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. Угловой коэффициент линейной зависимости ($y = bx$) вычисляется по формуле 3:

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

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;
 $S(H)_{ij}$ — аналитический сигнал определяемого вещества при исследовании i -го раствора;
 $S(H)_{cmij}$ — аналитический сигнал стандартного вещества при исследовании j -го измерения i -го раствора.

Для полученного углового коэффициента линейной зависимости выполняется проверка коэффициента аппроксимации R^2 , который определяется следующим выражением (4):

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

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; отклик определяемого вещества и стандартного вещества должны быть близкими (не отличаться более чем в десять раз);

Преимущества метода внутреннего стандарта: нет необходимости дозирования строго заданных количеств пробы и соблюдения постоянства всех параметров прибора; 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; при наличии существенных различий в составах матриц градуировочной серии растворов и реальных исследуемых образцов предварительно определяется процент выхода определяемых веществ из матриц (например, кровь или моча) этих образцов (усредненное значение из 8-10 проб).

Метод эталонной добавки с внутренним стандартом используется главным образом при анализе объектов, имеющих сложный химический состав, в которых поведение исследуемого аналита (вещества) определяется преимущественно характеристиками самого объекта (матрицы), его способностью к поддержанию различного рода побочных процессов (комплексобразование, 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 аналитического сигнала от величины добавки. Содержание компонента в исходной анализируемой смеси соответствует величине аналитического сигнала, определяемой экстраполяцией на нулевую добавку.

Основная цель метода эталонных добавок — обеспечение максимально точного соответствия условий градуировки и собственно определения. При использования 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 показаний прибора 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 подходы позволят применять количественную оценку лекарственных средств или примесей в различных растворах или субстанциях, не расходуя времени на поиск какой либо дополнительной специальной литературы, поскольку описаны основные методы количественного определения, применительно к любому аналитическому оборудованию без использования стандартных образцов сравнения.

Список литературы

1. СТБ ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений, ч.1-6.
2. Канарская О.К., Александров П.А. Экспертиза наркотических средств, получаемых из мака и конопли. Методические рекомендации. Минск: ГЭКЦ МВД Беларуси, 2009
3. 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.
4. Количественный газохроматографический анализ: Методические указания к выполнению лабораторной работы по курсу физико-химических методов анализа / Сост. В.Ф. Апраксин. СПб.: СПХФА, 1999. 12 с.
5. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. М.: Мир, 1989. 608 с



Министерство здравоохранения Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Северо-Западный государственный медицинский
университет имени И. И. Мечникова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России)

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
4-Й МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ХИМИКО-
БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК В ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ»,
ПОСВЯЩЕННОЙ 135-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ
ПРОФЕССОРА В. В. ЛЕБЕДИНСКОГО**

**Санкт-Петербург
7–8 декабря 2023 года**

Под редакцией Л. Б. Гайковой, Н. В. Бакулиной

Часть 1

**Санкт-Петербург
2023**