

Рекомендована д-м біол. наук, проф. Л.С. Фірою

УДК 615.07:54.062:543.422.7

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ФОТОКОЛОРИМЕТРІЇ В АНАЛІЗІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ: ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

© О.А. Євтіфєєва, В.А. Георгіянц

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: наведено результати вивчення валідаційних характеристик кількох фотометричних методик аналізу кількісного визначення лікарських засобів аптечного виготовлення дозволяють зробити висновок, що фотоколориметричне обладнання дозволяє в умовах аптеки чи лабораторії з контролю якості лікарських засобів отримувати коректні результати. За умови, що значення попередньо вивченої сумарної спектральної невизначеності обладнання, яке використовують, не перевищує вимоги специфікації для даного обладнання.

Ключові слова: фармацевтичний аналіз, екстемпоральні лікарські форми, метод фотоколориметрії.

Вступ. При проведенні внутрішньоаптечного контролю якості лікарських засобів аптечного виготовлення дуже часто використовують методи фотометрії. Фотометричні методи аналізу основані на вибіркового поглинанні електромагнітного випромінювання аналізованою речовиною і служать для дослідження будови, ідентифікації і кількісного аналізу світопоглинальних сполук. Залежно від використовуваної апаратури у фотометричному аналізі розрізня-

ють спектрофотометричні методи – аналіз із поглинання речовинами монохроматичного випромінювання, та фотоколориметричні методи – аналіз із поглинання речовинами немонохроматичного випромінювання. Часто аналітики розглядають метод фотоколориметрії як окремий випадок спектрофотометрії. Проте, з точки зору валідації, існує ряд відмінностей, які виділяють фотоколориметрію як окремий метод (табл.1).

Таблиця 1. Відмінні характеристики методів фотометрії

Спектрофотометричний метод:	Фотоколориметричний метод:
базується на поглинанні монохроматичного випромінювання	базується на поглинанні немонохроматичного випромінювання
обов'язкове підпорядкування аналізованих розчинів закону Бугера-Ламберта-Бера	об'єднаний закон Бугера-Ламберта-Бера застосовують з більшим або меншим наближенням залежно від ступеня незмінності величини оптичної густини (А) в зазначеному інтервалі довжин хвиль. Важливо, щоб у широкому інтервалі довжин хвиль дотримувався закон Бера
діапазон застосування від 200 до 800 нм	діапазон застосування від 315 нм до 980 нм
відлік за шкалою оптичної густини проводять з точністю до 0,001 одиниць А	відлік за шкалою оптичної густини проводять з точністю до 0,01 одиниць А
сумарна похибка визначення складає до 2 %	сумарна похибка визначення складає до 3 %
ДФУ регламентує загальні метрологічні характеристики для обладнання, яке використовують	обладнання нормується тільки виробником в технічній документації (специфікації) на конкретний прилад

Валідація аналітичної методики – це експериментальний доказ того, що методика придатна для роз'язання визначених завдань [6]. Тобто, у процесі валідації необхідно довести, що методика дозволяє контролювати якість даного лікарського засобу в умовах будь-якої іншої аптеки чи лабораторії з контролю якості лікарських засобів на будь-якому іншому обладнанні, за умови, що воно відповідає вимогам Фармакопеї та/або додатковим вимогам.

Фармакопейна модель застосування фотометричних методів в аналізі. Загальна стаття ДФУ 2.2.25 "Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях" містить загальні принципи проведення валідації аналітичних методик цього типу та рекомендує для вимірювання на даному діапазоні спектра використовувати як обладнання спектрофотометри, які повинні відповідати метрологічним характеристикам, наведеним у статті [6].

Тобто, проведення валідації методики, поперше, вимагає проведення визначення кваліфікації приладів, мірного посуду та іншого лабораторного обладнання. Теоретичного визначення відповідності характеристик приладу, які зазначені виробником у технічній документації (специфікації) недостатньо. Необхідно впевнитись, що обладнання є прийнятним для його прогнозованого використання [9].

Метрологічні характеристики приладів наведені у статті ДФУ 2.2.25 – це так звана “зовнішня

стандартизація” лабораторного спектрофотометричного обладнання. Метрологічними характеристиками обладнання називають його технічні характеристики, які впливають на результат та невизначеність виміру. Для кожного обладнання комплекс цих характеристик обирають та нормують таким чином, щоб за їх допомогою можна було оцінити невизначеність виміру. В таблиці 2 для порівняння наведено метрологічні характеристики для спектрофотометрів, які регламентує ДФУ та які наводить технічна документація для

Таблиця 2. Метрологічні характеристики фотометричного обладнання

Метрологічні характеристики фотометричного обладнання				
Характеристика	Вимоги ДФУ до спектрофотометрів	Фотометр КФК-3	Фотометр КФК-2	Фотометр КФК-2-УХЛА 4.2
Спектральний діапазон	200-800 нм	315-980 нм	315-980 нм	315-980 нм
Правильність шкали довжин хвиль	±1 нм для ультрафіолетового і ±3 нм для видимого діапазону	-	-	-
Правильність шкали оптичної густини $A_{E,r}$	1,3 % (235нм), 1,2 % (257нм), 3,4 % (313нм), 1,6 % (350нм)	-	-	-
Граничний рівень розсіяного світла	$A_{200\text{нм}}(\text{кювети}) > 2$	-	-	-
Роздільна здатність	Відношення A_{269}/A_{266} регламентується АНД	-	-	-
Кювети	Варіації у товщині шару не більше ±0,0005 см	-	-	-
Метрологічні характеристики, які наведено в специфікаціях обладнання				
Збіжність оптичної густини $S_{A,r}$	≤0,1-0,2 %	≤ 0,15 %	≤ 0,3 %	≤ 0,3 %
Кюветна відтворюваність $S_{\text{cell},r}$	≤ 0,1% (не наводиться у специфікаціях)	-	-	-
Суммарна спектральна невизначеність $S_{\text{sp},r} = \sqrt{S_{A,r}^2 + S_{\text{cell},r}^2}$	≤ 0,25 %	±0,5 %	±1,0 %	±1,0 %

фотометричного обладнання. Як бачимо, параметри “зовнішньої стандартизації” більш детально оцінюють вплив різних параметрів обладнання на якість отриманих результатів.

На практиці недодержання рекомендацій ДФУ дозволяє засумніватися в результатах аналізу, тобто дає підстави визнати висновки з якості лікарського засобу, які ґрунтуються на результатах проведеного аналізу на обладнанні, які не відповідають цим вимогам, недійсними.

Сьогодні в ДФУ не наводять рекомендації з валідації аналітичних методик фотоколориметричним методом, відсутні загальні метрологічні характеристики для фотоколориметрів так званої “зовнішня стандартизація”. Загальна стаття “Фотоколориметрія” (ДФ СРСР XI видання) [4] наводить лише загальні принципи використання фотоколориметричного методу, однак не

містить вимоги до обладнання цього типу. Фотоколориметри відносять до обладнання зі спрощеним способом монохроматизації за допомогою світлофільтрів.

До того ж, фотоколориметричне визначення, на відміну від спектрофотометричного, включає ще один етап: проведення хімічних реакцій для отримання сполуки, зручної для фотометрування. При виборі фотометричної реакції оцінюють такі властивості, як специфічність і чутливість. Крім того, вони повинні відповідати ще двом вимогам: хорошій відтворюваності забарвлення та її стійкості в часі. Тому при проведенні валідації фотоколориметричних методик кількісного визначення необхідно додатково визначати:

- значення рН модельного розчину, при якому спостерігається максимальне та стабільне значення оптичної густини при $C = \text{const}$;

– оптимальну кількість реагента, яку потрібно для повного зв'язування випробуваного іону в забарвлене сполучення;

– залежність світлопоглинання від часу.

Отже, похибка визначення фотоколориметричного методу (згідно з ГФ XI видання до 3 %) вища, ніж похибка спектрофотометрії (згідно з ДФУ до 2 %).

Проте метод фотоколориметрії є дуже перспективним для кількісного визначення лікарських засобів в умовах аптеки, але потребує стандартизації.

Використання методу фотоколориметрії суттєво обмежує відсутність “зовнішньої стандартизації” на обладнання цього типу.

Для підтвердження того, що методика може бути відтворена в будь-якій іншій аптеці чи лабораторії з контролю якості лікарських засобів, недостатньо результатів валідації в одній лабораторії, тому що рівень обладнання в різних аптеках може значно (чимало) варіювати. Повна невизначеність результату аналізу для кількісних випробувань є інтегральною характеристикою якості. Невизначеність – це довірчий інтервал, у межах якого з заданою ймовірністю знаходиться справжнє значення. Без оцінки невизначеності результату аналізу неможливо оцінити наскільки коректні отримані результати, тобто без оцінки невизначеності лабораторія не може гарантувати необхідну високу ймовірність того, що при аналізі в іншій лабораторії якості лікарського засобу буде зроблено такий самий висновок. Необхідний прогноз повної невизначеності методики згідно з вимогами, наведеними в ДФУ [6].

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не повинна перевищувати максимальну припустиму невизначеність результатів аналізу $\max \Delta_{As}$. Її визначають за формулою:

$$\Delta_{As} = \sqrt{(\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2)}$$
, де Δ_{As} – невизначеність пробопідготовки (зважування, узяття аліквот та ін.), яку розраховують із вимог до гранично припустимих похибок для мірного посуду та ваг; Δ_{FAO} – прогнозована невизначеність кінцевої аналітичної операції, яка залежить від точності аналітичного методу.

Невизначеність кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO} залежно від аналітичного методу, який застосовують, розраховують по-різному. Наприклад, у випадку спектрофотометричного аналізу при визначенні Δ_{FAO} використовують величину ($RSD_A=0,52\%$) відносного стандартного відхилення оптичної густини з виніманням кювети, яка була отримана при численному міжлабораторному експерименті [1]. Ця величина характеризує ту реальну точність, яка сьогодні може

бути досягнута у вітчизняних лабораторіях.

У випадку фотоколориметрії таке міжлабораторне (міжаптечне) тестування не проводилось. Чи достатньо для розрахунку прогнозованої невизначеності кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO} експериментально отриманих даних (відносного стандартного відхилення оптичної густини з виніманням кювети) сумарної фотоколориметричної похибки приладу, на якому буде проводитись дослідження?

Враховуючі усі вищезазначені аргументи, доцільним вважали проведення валідації кількох фотометричних методик аналізу кількісного визначення лікарських засобів аптечного виготовлення в умовах аптеки.

Методи дослідження. Фотометричне кількісне визначення лікарських форм аптечного виготовлення проводили методом стандарту за адаптованою стандартизованою схемою валідації [3,7,8,10]. При проведенні досліджень використовували субстанції, які відповідали вимогам Британської Фармакопеї [2], Фармакопеї США XXIV [11] та ДФУ [6].

Аналітичне обладнання: спектрофотометр 46 “Ломо”, фотометр фотоелектричний КФК-3, КФК-2, КФК-2-УХЛА 4.2; ваги AB 204 S/A METTLER TOLEDO, рН-метр PB-11, фірми “Sartorius AG” (Німеччина). Для роботи використовувався мірний посуд класу А (першого класу), який відповідає вимогам ДФУ, піпетки відповідають ДОСТ 29227-91.

Модельний розчин для визначення сумарної фотоколориметричної похибки готували за такою схемою: точну наважку 0,05 г поміщали у мірну колбу місткістю 250 мл і суспендували у 15 мл води Р. Коли субстанція цілком була замочена, додавали 170 мл води Р та перемішували до повного розчинення при нагріванні, доводячи до кипіння. Потім після повного охолодження до $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ доводили об'єм розчину водою Р до 250,0 мл. Далі за методикою готували розведення 5,0 мл одержаного розчину поміщали у мірну колбу місткістю 50 мл і доводили об'єм розчину водою Р до 50,0 мл.

Відразу після виготовлення вимірювали оптичну густину модельного розчину при довжині хвилі 440 нм за 30 вимірюваннями з вийманням кювети для кожного приладу відносно розчинника – вода Р. Вимірювання оптичної густини проводили з вийманням кювети. Статистичну обробку одержаних результатів проводили за схемою, зазначеною в ДФУ [6, 5].

Результати й обговорення. Методом спектрофотометрії було визначено безбарвні лікарські речовини: розчин прокаїну гідрохлориду 0,5 % [3] та розчин хлорамфеніколу 0,02 %; визначення забарвленого розчину рибофлавіну прово-

дили як на спектрофотометричному приладі СФ-46 [10], так і за допомогою фотоколориметра КФК-3 [7]; кількісне визначення розчину фурациліну 0,02 % проводили на фотоколориметрах різного класу (КФК-3, КФК-2, КФК-2-УХЛА 4.2.) з попереднім додаванням розчину натрію гідроксиду для посилення забарвлення [8].

Дослідження валідаційних характеристик: лінійності, правильності, точності на рівні збіжності та відтворюваності, а також робастності проводили згідно з ДФУ за адаптованою до аптечних умов стандартизованою схемою [7].

Перед проведенням фотоколориметричного визначення вивчено реальну сумарну фотометричну похибку приладів: КФК-3, КФК-2, КФК-2-УХЛА 4.2.

У випадку спектрофотометричного аналізу [5,7] Δ_{FAO} розраховували, враховуючи з наявності

2 розчинів (випробуваного та розчину порівняння), а також рекомендації не менш 3-х паралельних вимірюваннях оптичної густини з вийманням кювети для кожного розчину, за формулою

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \cdot \frac{RSD_A \cdot 1,65}{\sqrt{3}}, \text{ де } 1,65 \text{ коефіцієнт Гауса}$$

для однієї ймовірності 95 % [5].

Тобто, визначити Δ_{FAO} неможливо без вивчення сумарної фотоколориметричної похибки. Визначення RSDA проводили, розраховуючи відносно стандартне відхилення оптичної густини А модельного розчину зазначеної концентрації при довжині хвилі 440 нм за 30 вимірюваннями з вийманням кювети для кожного приладу [6]. Статистична обробка отриманих результатів наведена в таблиці 3. У випадку

Таблиця 3. Результати статистичної обробки експериментальних даних, отриманих при валідації фотометричних методик кількісного визначення лікарських форм аптечного виготовлення

Метрологічні характеристики фотометричного обладнання				
Характеристика	Вимоги ДФУ до спектрофотометрів	Фотометр КФК-3	Фотометр КФК-2	Фотометр КФК-2-УХЛА 4.2
Спектральний діапазон	200-800 нм	315-980 нм	315-980 нм	315-980 нм
Правильність шкали довжин хвиль	±1 нм для ультрафіолетового і ±3 нм для видимого діапазону	-	-	-
Правильність шкали оптичної густини А ($\Delta_{E,r}$)	1,3 % (235нм), 1,2 % (257нм), 3,4 % (313нм), 1,6 % (350нм)	-	-	-
Граничний рівень розсіяного світла	$A_{200\text{нм}}(\text{кювети}) > 2$	-	-	-
Роздільна здатність	Відношення A_{269}/A_{266} регламентується АНД	-	-	-
Кювети	Варіації у товщині шару не більше ±0,0005 см	-	-	-
Метрологічні характеристики, які наведено в специфікаціях обладнання				
Збіжність оптичної густини $S_{A,r}$	≤0,1-0,2 %	≤ 0,15 %	≤ 0,3 %	≤ 0,3 %
Кюветна відтворюваність $S_{\text{cell},r}$	≤ 0,1% (не наводиться у специфікаціях)	-	-	-
Суммарна спектральна невизначеність $S_{\text{sp},r} = \sqrt{S_{A,r}^2 + S_{\text{cell},r}^2}$	≤ 0,25 %	±0,5 %	±1,0 %	±1,0 %

визначення розчину фурациліну 0,02 % величина відносного стандартного відхилення оптичної густини для приладів різного класу складає $RSD_{A(\text{КФК-3})} = 0,20$, $RSD_{A(\text{КФК-2})} = 0,45$, $RSD_{A(\text{КФК-2-УХЛА4.2})} = 1,03$.

Відповідно, прогнозована невизначеність кінцевої аналітичної операції – для КФК-3 скла-

дає $\Delta_{FAO} = 0,27$, для КФК-2 - $\Delta_{FAO} = 0,61$, для КФК-2-УХЛ 4.2. - $\Delta_{FAO} = 0,39$ – прогнозовано повна невизначеність результатів аналізу - $\Delta_{FAO} = 0,76$,

$\Delta_{As} = \sqrt{1,39^2 + 0,76^2} = 1,58 < 4,8\% = \max \Delta_{As}$, тобто методика може бути коректно відтворена в умовах лабораторій та аптек на цьому типу обладнання (табл. 4).

Таблиця 4. Статистична обробка результатів визначення сумарної фотометричної погрішності приладів різного класу

Номер за/п	КФК-3	КФК-2	КФК-2-УХЛ 42
1	0,288	0,285	0,329
2	0,289	0,286	0,334
3	0,285	0,287	0,335
4	0,290	0,287	0,343
5	0,289	0,288	0,328
6	0,289	0,288	0,331
7	0,289	0,288	0,332
8	0,288	0,289	0,334
9	0,288	0,289	0,339
10	0,288	0,289	0,333
11	0,289	0,289	0,331
12	0,288	0,285	0,332
13	0,287	0,287	0,332
14	0,288	0,287	0,322
15	0,289	0,288	0,330
16	0,289	0,288	0,329
17	0,290	0,288	0,331
18	0,288	0,289	0,331
19	0,289	0,289	0,332
20	0,288	0,289	0,332
21	0,287	0,288	0,331
22	0,288	0,287	0,331
23	0,288	0,287	0,331
24	0,289	0,287	0,332
25	0,289	0,288	0,333
26	0,288	0,287	0,333
27	0,289	0,286	0,331
28	0,290	0,287	0,331
29	0,290	0,285	0,333
30	0,289	0,285	0,333
середнє А	0,2885	0,2874	0,3320
стандартне відхилення S _A %	0,058	0,13	0,34
RSD _{sp,r} %	0,20	0,45	1,03
Δ _{FAO}	0,27	0,61	1,39

Висновки. Проведено визначення сумарної фотометричної похибки фотоколориметрів різного класу: КФК-3, КФК-2, КФК-2-УХЛ 4.2. За допомогою отриманих експериментальних даних обчислено невизначеність вимірів означених приладів та розраховано повну невизначеність аналізу за фотометричними методиками.

Результати дослідження дозволяють зробити

висновок, що фотоколориметричне обладнання дозволяє в умовах аптеки чи лабораторії з контролю якості лікарських засобів отримувати коректні результати. За умови, що значення попереднього вивченої сумарної спектральної невизначеності обладнання, яке використовується, не перевищує вимоги специфікації для даного обладнання.

Література

1. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях / А.И. Гризодуб, Н.Н. Зволинская, Н.Н. Архипова, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Т.Н. Доценко // Фармаком. – 2004. – № 2. – С. 20-34.
2. British Pharmacopoeia, (2001), Vol. 11, Appendix III, A 141-A144.
3. Георгиянц В.А., Евтифеева О.А., Савченко Л.П. Применение метода спектрофотометрии для количественного определения прокаина гидрохлорида в лекарственных формах аптечного изготовления // Запорожский медицинский журнал. – 2007. – № 2. – С. 129-133.
4. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа/МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1987. – 336 с., ил.
5. Гризодуб А.И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // Фармаком. – 2006. – № 1/2. – С. 35-44.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – С. 556 с., Доповнення 1. – Харків: PIPEГ. – 2004. – 520с., Доповнення 2. – Харків: PIPEГ. – 2008. – 608 с.
7. Евтифеева О.А., Георгиянц В.А. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения экстенпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 69-81.
8. Критичний аналіз методик фотометричного визначення нітрофуралу в водних розчинах / О.А. Євтифеева, В.А. Георгіянц, К.І. Проскуріна, С.М. Губарь // Український вісник психоневрології. – 2006. – Вип. 2 (47). – С. 77-83.
9. Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И. Метрологический контроль качества результатов измерений // Фармаком. – 2007. – № 2. – С. 16-25.
10. Наукове обґрунтування використання спектрофотометричного методу кількісного визначення розчину рибофлавіну аптечного виготовлення / О.А. Євтифеева, В.А. Георгіянц, О.А. Здорик, Л.В. Бондарева // Медична хімія. – 2006. – Т. 8, № 4. – С. 12-18.
11. The United States Pharmacopoeia, XXIV ed. – United States Pharmacopoeia Convention, Inc, 2000. – P. 2149.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ФОТОКОЛОРИМЕТРИИ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ АПТЕЧНОГО ПРИГОТОВЛЕНИЯ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

О.А. Евтифеева, В.А. Георгиянц

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: приводятся результаты изучения валидационных характеристик нескольких фотометрических методик количественного анализа лекарственных средств аптечного приготовления, которые позволяют сделать вывод, что фотоколориметрическое оборудование позволяет в условиях аптеки или лаборатории по контролю качества лекарственных средств получать корректные результаты. При условии, что значение предварительно изученной суммарной спектральной неопределенности используемого оборудования не превышает требования спецификации для данного прибора.

Ключевые слова: фармацевтический анализ, экстенпоральные лекарственные формы, метод фотоколориметрии.

THE PRACTICE OF THE PHOTOCOLORIMETRIC METHOD IN ANALYSIS OF THE MEDICATIONS OF THE PHARMACY'S MANUFACTURING: PROBLEMS AND PROSPECTS

O. Evtifeyeva, V. Georgiyants

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: Results of studying of the parameters of the validation of some photometric methods of quantitative determination of medications by pharmacy's manufacturing were presented. It has allowed to come to conclusion about suitability of the given correct results of photocolourimetric equipments in the condition of pharmacy and laboratory of the quality control of medications. In the context of the meaning previous studying, the total spectral uncertainty of the equipment doesn't exceed requirements of their specification.

Key words: pharmaceutical analysis, extemporal prescriptions, photometric methods.