

УДК 615.07: 543.061

О. А. ЄВТИФЄЄВА

Національний фармацевтичний університет

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ПІДХОДІВ ДО ОЦІНКИ ХІМІЧНИХ МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ РЕЧОВИН, ЯКІ ВХОДЯТЬ ДО СКЛАДУ ЕКСТЕМПОРАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

Вперше проведено науково-теоретичне обґрунтування підходів до оцінки хімічних методів ідентифікації лікарських речовин, які входять до складу аптечних лікарських форм. Запропоновано проводити оцінку достовірності аналітичної методики за допомогою статистичної обробки результатів експерименту або «кривих ефективності» залежно від вмісту аналіту за прописом у лікарській формі.

Ключові слова: фармацевтичний аналіз; хімічні методи ідентифікації; екстемпоральна рецептура

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Ідентифікація — одна з найважливіших складових хімічного контролю якості лікарських препаратів, виготовлених в аптечних умовах. Як і всі випробування, необхідні для визначення відповідності вимогам якості лікарських препаратів, випробування на «ідентифікацію» повинні бути валідовані [1, 2].

При ідентифікації лікарських речовин аптечного виготовлення широкого застосування дістав хімічний метод аналізу. Сьогодні хімічні методи якісного аналізу добре вивчені. Відкриття нових хімічних методів ідентифікації є задачею сумнівною. Однак, визначені раніше методи ідентифікації лікарських речовин у складі екстемпоральних лікарських форм повинні бути переглянуті з метою удосконалення та розширення їх для розв'язання нових задач. Також ці методи повинні бути перевірені на відповідність сучасним вимогам і стандартам.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Питанням метрології якісного аналізу присвячено цілу низку робіт [3–5]. На жаль, сьогодні не існує єдиного підходу як до оцінки метрологічних характеристик методик якісного аналізу (ідентифікації), так і до термінології. Це спричиняє неоднозначне тлумачення поняття та визначення характеристик аналітичних методик ідентифікації.

ВИДІЛЕННЯ НЕ ВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Питання формування загальних принципів та вимог до проведення процесу валідації методик ідентифікації дуже важливе й актуальне. В ЄФ [1] і ДФУ [2] для оцінки прийнятності методик ідентифікації рекомендується проводити тільки визначення специфічності. Однак, алгоритми проведення експериментальної оцінки непрописані, відсутні стандарти якісного хімічного аналізу. Для взаємного узгодженого оцінювання результатів потрібен практичний систематичний підхід до метрологічної оцінки аналітичних методик якісного аналізу.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Дана робота є першою спробою стандартизувати підхід до валідації хімічних методик ідентифікації речовин, які входять до складу лікарських форм аптечного виготовлення.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою валідації якісних методів є підбір прийнятних для даних умов методів ідентифікації аналізованих речовин, які дозволяють виявити окрему речовину з прийнятним рівнем достовірності.

1. Огляд валідаційних характеристик. Стратегія вивчення «специфічності» цілком залежить від хімічної будови аналіту та складу лікарського засобу. Специфічність «ідентифікації» повинна бути такою, щоб відрізнити активну та допоміжні речовини, які мають подібну структуру.

Для підтвердження специфічності лікарських речовин в екстемпоральних лікарських формах також необхідно обрати методи, які у поєднанні повинні цілком відрізнити речовину від інших речовин у разі помилкового використання при виготовленні препарату. Методики якісного аналізу мусять бути не дуже чутливими, щоб запобігти хибній позитивній реакції, яка може бути викликана наявністю припустимих домішок, та не повинні вимагати більшого об'єму експериментальних досліджень, ніж необхідно, щоб диференціювати досліджувану речовину серед інших фармацевтичних речовин.

Найбільшою достовірністю відрізняються методики, наведені в Фармакопеї. Дані реакції необхідно використовувати в першу чергу, але за умови пристосування до задачі випробування (наприклад, після розділення компонентів та розведення або концентрування до необхідного рівня концентрації аналіту). Вибір реакцій за іншою довідковою та науковою літературою потребує більш ретельної перевірки та об'єму досліджень (наприклад, перевірка впливу співвідношень реагентів на чіткість і стійкість ефекту реакції, надійності ідентифікації тощо).

Достовірність. Другий не менш важливий аспект аналітичних методик ідентифікації — це рівень їхньої надійності або достовірності [3, 4]. Тобто цей аспект метрологічний. У метрології в рамках концепції невизначеностей оцінка «достовірності/недостовірності» результату ідентифікації можлива за допомогою алгоритмів ймовірності [4–7]. У нашому випадку для практичного застосування найбільш цінними є методики з низькою ймовірністю виявлення дійсно присутньої речовини (похибка I роду). Теоретично оцінка сумарної ймовірності для методик якісного аналізу, які включають n випробувань за одиничною ознакою (наприклад, в різних умовах для розчину однієї концентрації N_k), представлена в табл. 1 [7, 8]. Передбачається, що одиничні ймовірності α і β є постійними. Умова ідентифікації — збіг ознак проби і «свідка» в кожному випробуванні. Як видно, мінімаль-

ний об'єм досліджуваної вибірки, проби якої містять аналіт (N_k), при очікуваній частоті виявлення аналіту $\alpha < 0.05$ за однією ознакою для забезпечення прийнятної рівня ймовірності виявлення аналіту $P_{(C)} = 0,95$ дорівнює 60. У ході досліджень за декількома ознаками об'єм вибірки суттєво зростає. Зниженню трудомісткості і підвищенню надійності визначення метрологічних характеристик методик ідентифікації сприяє обмеження набору факторів, які впливають на залежність $P_{(C)}$ (наприклад, проведення дослідження в різних лабораторіях, різними аналітиками, різними наборами реагентів). Зауважимо, що обидві складові ймовірності взаємно протилежно пов'язані. Тобто при зменшенні ймовірності виявлення дійсно присутньої речовини α , ймовірність хибної ідентифікації відсутньої речовини β зростає і навпаки. Таким чином, враховуючи різну значимість похибок I і II роду, поняття «достовірність/недостовірність» пов'язують тільки з ймовірністю більш значимої похибки I роду [9]. У цьому випадку «достовірність» (R) дорівнює $R_{\text{виявлення}} = 100 \times P_{(C)}$, достовірність — $\text{unreliability} = 100 - R$.

Робастність — це здатність аналітичного методу протистояти впливу змін в експериментальних умовах, які можуть бути підпорядковані коливанню різних чинників (наприклад, стабільності реактивів, складу зразку, рН-середовища, температури). Будь-які зміни, які можуть вплинути на аналітичний результат, повинні бути зазначені, а також оцінено їх вплив як міру критичності на достовірність «ідентифікації» для заданого рівня ймовірності.

2. Формулювання основних умов проведення процедури валідації. За своїм характером випробування на ідентифікацію хімічними методами можна визначити як бінарну опозицію або бінарний відгук (аналіт виявлено/аналіт не виявлено, ТАК/НІ) [3–5]. У результаті проведення хімічної реакції аналітичним сигналом може бути виникнення або змінення кольору при хромогенній реакції, виникнення або зникнення флуоресценції, створення осаду, поява запаху. Залежно від ха-

Таблиця 1

ОЦІНКА СУМАРНОЇ ЙМОВІРНОСТІ МЕТОДИК ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗА ОДИНИЧНОЮ ОЗНАКОЮ ДЛЯ n ВИПРОБУВАНЬ

Кількість випробувань, n	α_n ($\alpha = 0,05$)	β_n ($\beta = 0,05$)	$P_{\Sigma} = \alpha_n + \beta_n$
1	0,05	0,05	0,1
2	0,0025	0,0975	0,1
5	$< 0,001$ ($3,1 \times 10^{-6}$)	0,23	0,23
10	$< 0,001$	0,40	0,40
60	$< 0,001$	0,95	0,95
100	$< 0,001$	0,99	1,0

рактору хімічної реакції, що лежить в основі ідентифікації аналіту, розрізняється набір факторів, які впливають на чіткість і/або стійкість ефекту реакції. Провідною характеристикою кожної хімічної реакції звичайно є «межа виявлення» [5, 10]. Для методик з бінарним відгуком «межею виявлення» вважають концентрацію аналіту, вище за яку позитивна реакція надійна, з рівнем достовірності 95 % або 99 %, а нижче за яку позитивна ідентифікація стає сумнівною [3]. Слід зазначити, що при аналізі аптечних лікарських форм, факт виявлення аналіту в межах мінімального діапазону застосування методики, який залежить від концентрації аналіту за прописом та допусків вмісту за АНД, нас цікавить більше, ніж «межа виявлення» аналіту в умовах окремої реакції.

2.1. Вимоги до аналітичного діапазону методики. Відповідно до ДФУ мінімальний допустимий діапазон застосування аналітичної методики ідентифікації окремо не регламентується [2]. Очевидно, діапазон застосування методики залежить від її призначення та пов'язаний з допусками вмісту окремого інгредієнту за вимогами АНД. Іншими словами, діапазон застосування методики — це той інтервал концентрації, на якому аналітична методика повинна давати гарантовану відповідь з обраною довірчою ймовірністю [4]. Тому, на наш погляд, для методик ідентифікації діючої речовини доцільно запропонувати ті ж самі вимоги до мінімального припустимого діапазону застосування, що і для методик кількісного визначення.

2.2. Вибір схеми валідації методики ідентифікації. Особливістю аналізу якості лікарських форм аптечного виготовлення є використання аліквот невеликих за об'ємом або масою. Важливо, щоб вміст аналіту в аліквоті знаходився в межах визначення обраним аналітичним методом. Концентрація аналіту за прописом суттєво впливає на вибір прийнятної методики ідентифікації. Розглянемо вплив величини вмісту аналіту за прописом на планування процедури для вив-

чення найбільш важливих параметрів методики ідентифікації (табл. 2). У межах мінімального припустимого діапазону застосування методики різниця концентрації аналіту $\Delta C = C_{120\%} - C_{80\%}$ для різних концентрацій аналіту в лікарській формі сильно варіюється від 0,2 до 100 мг/мл. Зі збільшенням концентрації аналіту за прописом значимість факторів, які впливають на стійкість і чіткість ефекту хімічної реакції, змінюється. Наприклад, для розчинів з концентрацією аналіту до 1 % вирішальним фактором швидше буде варіювання вмісту аналіту в аліквоті для аналізу, ніж умови протікання даного типу хімічної реакції (співвідношення реагентів реакції, рН, температура та інші.). Для цих концентрацій аналіту головним питанням є, яка кількість аналіту за даних умов дає достовірний ефект.

Зі збільшенням концентрації аналіту за прописом збільшується приріст концентрації від проби до проби ($\Delta C = C_2 - C_1$; від 0,02 до 10 мг/мл), що призводить до ймовірності похибки I роду внаслідок суттєвої зміни співвідношень аналіту і реагентів хімічної реакції. Концентрація ж аналіту в даному випадку значно вища за «межу виявлення» даної реакції, тому для цих концентрацій важливіше визначити доцільне співвідношення реагентів та умови протікання реакції на всьому діапазоні застосування методики.

2.3. Оцінка достовірності хімічних методів ідентифікації із вмістом лікарських речовин біля «межі виявлення». Цю оцінку доцільно проводити шляхом відображення залежності ймовірності виявлення аналіту ($P_{(C)}$) від його концентрації (C_r).

При проведенні дослідження використовують N зразків відомого складу, з яких N_k містять аналіт A в різній концентрації в межах мінімального діапазону застосування методики (80,90,100,110,120 %). Експериментальні дослідження проводять у трьох різних лабораторіях, із різним набором реактивів, різними аналітиками на трьох різних серіях модельних розчинів.

Таблиця 2

**ВПЛИВ ВИХІДНОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ АНАЛІТУ ЗА ПРОПИСОМ
НА ПЛАНУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ З ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ**

Вихідна концентрація C %, мг/мл	$\Delta C = C_{120\%} - C_{80\%}$, мг/мл, (у межах мінімального діапазону застосування)	$\Delta C = C_2 - C_1$, мг/мл, (крок = 10 %)
0,02 % (0,2 мг/мл)	0,16–0,24 мг/мл	0,02 мг/мл
0,1 % (1 мг/мл)	0,8–1,2 мг/мл	0,1 мг/мл
0,5 % (5 мг/мл)	4–6 мг/мл	0,5 мг/мл
1,0 % (10 мг/мл)	8–12 мг/мл	1 мг/мл
2,0 % (20 мг/мл)	16–24 мг/мл	2 мг/мл
5,0 % (50 мг/мл)	40–60 мг/мл	5 мг/мл
10,0 % (100 мг/мл)	80–120 мг/мл	10 мг/мл

У кожній серії модельних розчинів для кожної окремої концентрації проводять 20 дослідів ($N_k^i = 20$). Таким чином, для кожного значення концентрації отримують 60 результатів трьох серій спостережень ($\bar{N}_k = 60$). Щоб уникнути можливості хибної позитивної реакції відсутньої речовини, паралельно проводять дослідження з використанням «холостого» досліду. Ефект кожної реакції порівнюють з ефектом, який дає дана речовина за стандартною методикою («свідок»). За результатами проведення експерименту розраховують частоти невиявлення речовини в кожній серії за формулою $\alpha_k = n_k / N_k$, де n_k — число негативних результатів при свідомій присутності аналіту в аликвоті, N_k — загальна кількість розчинів з аналітом в аликвоті для концентрації C_k . Далі розраховують ймовірність виявлення аналіту за умовами даної методики:

$$P_{(C_k)} = 1 - \alpha_k, \quad \text{середні значення } \bar{P}_{C_k} = \frac{1}{m} \times \sum_{i=1}^m P_{C_k}^i$$

і $\bar{\alpha}_k = 1 - \bar{P}_{C_k}$ між лабораторіями в рамках однієї концентрації, де m — кількість лабораторій. Побудову «кривих ефективності» проводять використовуючи значення концентрації аналіту по осі абсцис, і отримані середні значення $\bar{\alpha}_k$ і $\bar{P}_{(C_k)}$ по осі ординат.

На практиці гранична концентрація розвивається в інтервал ненадійності (ΔC) (рис.1). За дослідженнями інших авторів [5], межами інтервалу ненадійності є нижня та верхня граничні концентрації $C_{0,05}$ і $C_{0,95}$, для яких ймовірності виявлення аналіту складають більше 5% або 1% та менше 95% або 99%, відповідно. У даному випадку концентрацію $C_{0,95}$ вважають «межею виявлення». При даному підході до оцінки достовірності методики ідентифікації аналізу основними метрологічними характеристиками є інтервал ненадійності ΔC та відносна ширина ін-

тервалу ненадійності $\frac{\Delta C}{C_{0,05}}$ (рис.1) [8]. На рисунку

видно, що з підвищенням ймовірності виявлення дійсно присутньої речовини $P_{(C)}$, частота α невиявлення дійсно присутньої речовини зменшується. При концентрації $C_{0,95} = 35$ мг/мл або вище за даною методикою можна ідентифікувати речовину в даній лікарській формі з достовірністю 95%. На рисунку виділено нижню та верхню граничні концентрації $C_{0,05} = 18$ мг/мл і $C_{0,95} = 35$ мг/мл, що дозволяє зробити висновок, що дана реакція характеризується шириною інтервалу надійності 17 мг/мл та відносною шириною інтервалу ненадійності 0,94.

Вивчення характеру розподілу експериментальних даних при варіюванні різних умов реак-

ції (наприклад, якість реактивів, різні аналітики та інше) дозволяє зробити висновок про фактори, які сприяють ідентифікаційним похибкам (рис.2). На рисунку 2 відбиті результати вивчення хімічної реакції в умовах різних лабораторій: різна суб'єктивна оцінка результатів реакції, якість застосовуваних реагентів, правильність виконання та інше. Як видно, відносна ширина інтервалу ненадійності змінюється при такому варіюванні. Наприклад, інтервал ненадійності для кожної лабораторії складає $\Delta C^1 = 25$ мг/мл, $\Delta C^2 = 9$ мг/мл, $\Delta C^3 = 16$ мг/мл, відносна ширина інтервалу ненадійності дорівнює для першої лабораторії 1,39, для другої лабораторії — 0,53, для третьої — 1,07.

2.4. Дослідження лікарських форм із вмістом аналіту, що значно перевищує «межу виявлення». Для лікарських форм із вмістом аналіту, що значно перевищує «межу виявлення» при проведенні дослідження, «криві ефективності» не дають бажаного результату. Доцільно для об-

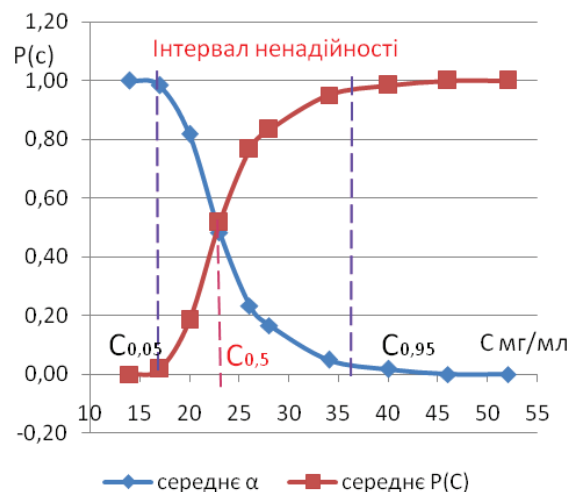


Рис. 1. Залежність ймовірності виявлення аналіту ($P_{(C)}$) від його концентрації (C_k)

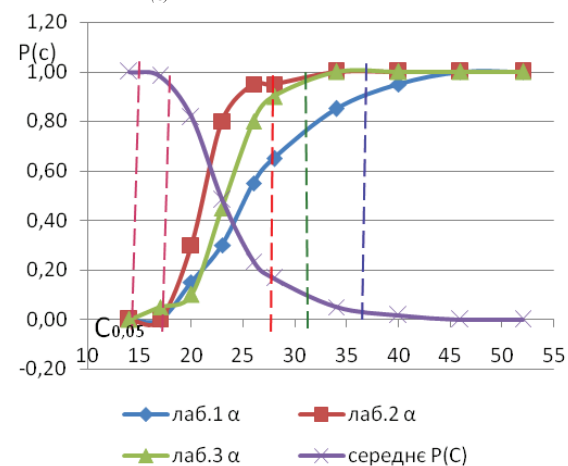


Рис. 2. Характер розподілу експериментальних даних при варіюванні різних умов реакції

робки експериментальних даних застосовувати статистичний підхід. При плануванні експерименту більше уваги приділяється впливу змін експериментальних умов на стійкість аналітичного ефекту. Тому експеримент планують так, щоб при проведенні створити варіювання факторів впливу на результат хімічної реакції. Дослідження проводять за схемою, наведеною вище. Оскільки при даному дослідженні аліквота лікарської форми для кожного з модельних розчинів однакова, а змінюється співвідношення реагентів або інші умови, в рамках кожного окремого набору експериментальних даних значення частот кожної концентрації усереднювали, розраховуючи загальну частоту $\hat{\alpha}$, загальну ймовірність $\overline{P_{C_k}}$ та стандартне відхилення S_{P_i} . У таблиці 3 наведено приклад обробки експериментальних даних за такою схемою.

Результати статистичної обробки (табл. 3) свідчать, що при зміні співвідношення об'ємів лікарської форми і реагенту від 1:1 до 1:3, частота невиявлення аналіту при свідомій його присутності зменшується від 0,71 до 0,05, відповідно ймовірність і достовірність виявлення збільшуються від 0,29 до 0,95 та від 29% до 95%. Стандартне відхилення характеризує розкид результатів реакції ідентифікації навколо середньої частоти невиявлення $\hat{\alpha}$ і відображає вплив умов проведення реакції на її результат в різних лабораторіях.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

Уперше проведено науково-теоретичне обґрунтування підходів до оцінки хімічних методів ідентифікації лікарських речовин, які входять до складу аптечних лікарських форм. Для лікарських форм зі вмістом аналіту, які значно перевищують «межу виявлення», оцінку достовірності аналітичної методики запропоновано проводити за допомогою статистичної обробки результатів експерименту. Оцінку

достовірності хімічних методів ідентифікації лікарських речовин біля «межі виявлення» запропоновано проводити за допомогою «кривих ефективності».

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. European Pharmacopoeia. — 5th ed. — Electronic version. — 2779 p.
2. Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: ПІРЕГ, 2001. — 556 с.
3. Ester Trullols, Itziar Ruisanchez fnd Xavier Rius. Validation of qualitative analytical methods./TrAC Trends in Analytical Chemistry. — February 2004. — Vol. 23, Issue 2. — pp. 137-145.
4. Rhos et al. The European Commission has supported the G6MA-CT-2000-01012 project on «Metrology of Qualitative Chemical Analysis» (MEQUALAN), which was developed during 2000-2002./Accred. Qual. Assur. — 2003. — V. 8, No. 2. — P. 68-77.
5. Valcarcel M., Barcelo D., Cardenas S et. Al. Metrology of qualitative chemical analysis. — Luxembourg: office for official Publications of the European Communities. — 2002. — 166 p.
6. Дёрффель К. Статистика в аналитической химии./К. Дёрффель. Пер. с нем. — М.: Мир, 1994. — 268 с.
7. Нейман Ю. Вводный курс теории вероятностей и математической статистики./Ю. Нейман — М.: Наука, 1968. — 448 с.
8. Методики качественного анализа с бинарным откликом: метрологические характеристики и вычислительные аспекты/А. В. Пантелеймонов, Н. А. Никитана, Е. А. Решетняк, Л. П. Логинова, А. А. Бугаевский, Ю. В. Холин//Методы и объекты химического анализа. — 2008. — т. 3. — № 2. — С.128-146.

Таблиця 3

СУМАРНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ УМОВ ПРОТІКАННЯ РЕАКЦІЇ

Модельний розчин %	1мл лік. ф.+1 мл реагенту А			1мл лік. ф.+2 мл реагенту А			1мл лік. ф.+3 мл реагенту А		
	$\hat{\alpha}_k^*$	$\overline{P_{C_k}}^*$	$S_{P_i}^*$	$\hat{\alpha}_k^*$	$\overline{P_{C_k}}^*$	$S_{P_i}^*$	$\hat{\alpha}_k^*$	$\overline{P_{C_k}}^*$	$S_{P_i}^*$
80	0,65	0,35	0,10	0,30	0,70	0,05	0,02	0,98	0,03
90	0,63	0,37	0,06	0,37	0,63	0,06	0,05	0,95	0,09
100	0,63	0,37	0,12	0,38	0,62	0,08	0,03	0,97	0,03
110	0,83	0,17	0,08	0,55	0,45	0,13	0,07	0,93	0,12
120	0,78	0,22	0,13	0,57	0,43	0,08	0,08	0,92	0,06
загальне середнє	0,71	0,29	0,10	0,43	0,57	0,08	0,05	0,95	0,06
стандартне відхилення	0,09	0,09	0,03	0,12	0,12	0,03	0,03	0,03	0,04

* середнє значення, отримане за результатами дослідження в трьох лабораторіях

УДК 615.07: 543.061

О. А. Евтифеева

**СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К ОЦЕНКЕ ХИМИЧЕСКИХ
МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВЕЩЕСТВ, КОТОРЫЕ ВХОДЯТ
В СОСТАВ ЭКСТЕМПОРАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Впервые проведено научно-теоретическое обоснование подходов к оценке химических методов идентификации лекарственных веществ, которые входят в состав аптечных лекарственных форм. Предложено проводить оценку достоверности аналитической методики с помощью статистической обработки результатов или с помощью «кривых эффективности» в зависимости от содержания аналита по прописи в лекарственной форме.

Ключевые слова: фармацевтический анализ, химические методы идентификации, экстремпоральная рецептура

UDC 615.07: 543.061

O. A. Yevtifeyeva

**STANDARDIZATION OF APPROACHES TO AN ESTIMATION CHEMICAL
METHODS IDENTIFICATION OF SUBSTANCES, THOSE ENTER INTO
THE COMPOSITION OF EXTEMPORANEOUS PREPARATION**

For the first time the scientific-theoretical substantiation of approaches to an estimation of chemical methods identification of medicinal substances those enter into the composition of extemporaneous preparation was conducted. It was offered, depending on the maintenance of analyte in medicinal formulation, an estimation of reliability an analytical technique to spend by means of statistical processing results or with the help of «efficiency curves».

Key words: the pharmaceutical analysis, chemical methods identification, extemporaneous preparation

Адреса для листування:
E-mail: kssl.evt@mail.ru

Надійшла до редакції: 15.04.10