

Теоретична оцінка повної невизначеності пробопідготовки при спектрофотометричному аналізі

О.А.Євтіфєєва

Національний фармацевтичний університет, кафедра аналітичної хімії
Харків, Україна

Проведено теоретичну оцінку повної невизначеності пробопідготовки при спектрофотометричному кількісному визначенні методом стандарту та аналіз факторів, що на неї впливають. Розроблено розрахункову таблицю для оцінки невизначеності складових пробопідготовки за методом стандарту, що дозволяє адаптувати та удосконалювати пробопідготовку відповідно до завдання аналізу.

Ключові слова: стандартизація, спектрофотометричний метод аналізу, пробопідготовка.

ВСТУП

Висновок про коректність застосування аналітичної методики при контролі якості ЛЗ засновується на оцінці її метрологічних характеристик шляхом порівняння практично отриманої (бажано в межах міжлабораторного експерименту) невизначеності аналізу, теоретичного прогнозу повної невизначеності аналізу, який формулюється з урахуванням особливостей аналітичного методу та випробовуваної методики, з максимально припустимою невизначеністю аналізу, яка не залежить від аналітичного методу і формується на основі допусків вмісту [1, 2].

Процес аналізу (*аналітичний цикл*) — процедура отримання опитним шляхом даних про хімічний вміст об'єкту, що досліджується. Процес аналізу має наступні загальні складові: 1) формулювання конкретного аналітичного завдання (постановка мети завдання) 2) вибір оптимальної методики, 3) пробовідбір (відбір проби зразку цього об'єкту), 3) зберігання

проб, 4) оцінка та проведення необхідної пробопідготовки, 5) аналітичне визначення аналіту в пробі шляхом вимірювання відповідного аналітичного сигналу, 6) статистична обробка результатів, 7) висновки. Пробопідготовка — це комплекс раціональних дій над об'єктом аналізу з метою перетворення проби у форму, прийнятну для подальшого аналізу. Пробопідготовка є важливим етапом *аналітичного циклу* та необхідна для покращення метрологічних характеристик аналізу: підвищення точності, надійності, правильності та відтворюваності визначення, розширення досліджуваного діапазону значень, прискорення тесту, зменшення похибки результатів аналізу. Характер пробопідготовки визначається природою зразку та аналітичним методом, що використовується для подальшого аналізу [3]. Одним з найбільш поширених фізико-хімічних методів аналізу лікарських засобів є метод абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій і видимій ділянках. В результаті досліджень, проведених з метою розробки процедури валідації методик спектрофотометричного визначення, встановлено, що однією зі значущих причини отримання незадовільних результатів в цьому методі аналізу є некоректна пробопідготовка [4-6].

Метою нашої роботи є теоретична оцінка повної невизначеності пробопідготовки при спектрофотометричному визначенні вмісту лікарських речовин методом стандарту та аналіз факторів, що на неї впливають.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

При попередньому опрацюванні обраної аналітичної методики, особливо для спектрофотометричного вимірювання, доцільно провести теоретичний розрахунок невизначеності аналітичних операцій з використанням вагів та

ТАБЛИЦЯ 1

Максимальна відносна похибка при приготуванні стандартного розчину відповідно до вимог ДСТУ ISO

Задана концентрація	Приготування розчинів	Відносна невизначеність в %				
		Маса*	Об'єм**		Загальна	
			клас А	клас В	клас А	клас В
10 г/1000 мл (1,00%)	10 г/1000 мл	<0,01	0,03	0,06	0,03	0,06
	1 г/100 мл	0,02	0,08	0,16	0,08	0,16
	0,5 г/50 мл	0,04	0,10	0,2	0,11	0,20
	0,25 г/25 мл	0,08	0,12	0,24	0,14	0,25
	0,1г/10 мл	0,02	0,20	0,40	0,28	0,45
1 г/1000 мл (0,10%)	1 г/1000 мл	0,02	0,03	0,06	0,04	0,06
	0,5 г/500 мл	0,04	0,04	0,08	0,06	0,09
	0,25 г/250 мл	0,08	0,05	0,10	0,09	0,12
	100 мг/100 мл	0,20	0,08	0,16	0,22	0,26
	50 мг/50 мл	0,40	0,10	0,10	0,41	0,45
	10 мг/10 мл	2,00	0,20	0,40	2,01	2,04
0,1 г/1000 мл (0,01%)	100 мг/1000 мл	0,20	0,03	0,06	0,22	0,26
	50 мг/500 мл	0,40	0,04	0,08	0,40	0,41
	25 мг/250 мл	0,80	0,05	0,10	0,80	0,81
	10 мг/100 мл	2,00	0,08	0,16	2,00	2,01
	5 мг/50 мл	4,00	0,10	0,20	4,00	4,00
	1 мг/10 мл	20,00	0,20	0,40	20,00	20,00
0,01 г/1000 мл (0,001%)	10 мг/1000 мл	2,00	0,03	0,06	2,00	2,00
	5 мг/500 мл	4,00	0,04	0,08	4,00	4,00
	1 мг/100 мл	20,00	0,08	0,16	20,00	20,00

Примітки: * – для оцінки відносної невизначеності процедури відважування використовували значення невизначеності 0,2 мг (вимоги ДФУ) [1]; ** – для оцінки відносної помилки процедури приготування стандартного розчину використовували вимоги ДСТУ ISO до правильності мірного посуду класу А та класу В [8, 9].

мірного посуду. Це дозволяє запобігти невірному використанню дуже малої кількості лікарської форми або надмірному витрачання розчинників.

Порядок розведення повинен бути пристосованим для вирішення завдання аналізу. У цьому контексті кожна з процедур (операцій) (один-два-три кроки розведення) при розведенні роблять внесок у випадкову помилку при підготовці. Тому важливо перед експериментом проводити теоретичну оцінку невизначеності прободготовки, щоб визначитися, чи є ця операція критичною для мети аналізу, і спочатку визначитися з оптимальним порядком розведення з урахуванням відносних помилок (повна правильність розділена на номінальний об'єм) з різними наважками, об'ємними піпетками, колбами [5, 6].

Особливо цей аспект набуває важливості при застосуванні методу стандарту при спектрофотометричному кількісному визначенні,

який потребує додаткового виготовлення стандартних розчинів.

Доцільний підбір скляного мірного посуду відповідно до мети. Відзначимо, що до введення в дію вимог ДФУ до використання при аналізі мірного посуду класу А в практиці лабораторій з аналізу та виробничих аптек як при приготуванні, так і при аналізі застосовували мірний посуд класу В [7].

Щоб оцінити та мінімізувати невизначеність прободготовки при приготуванні аналітичних розчинів, ми провели теоретичний розрахунок невизначеності приготування стандартного розчину (табл. 1) та оцінку відносної невизначеності підготовки розведення випробовуваного розчину (табл. 2) з урахуванням критичних метрологічних значень аналітичних вагів та об'ємного мірного посуду як для класу А, так і для мірного посуду класу В відповідно до ДСТУ ISO [8, 9].

ТАБЛИЦЯ 2

Максимальна відносна похибка процесу розведення випробовуваного розчину відповідно до вимог ДСТУ ISO

Відношення концентрації	Кількість кроків	Крок 1		Крок 2		Крок 3		Відносна невизначеність	
		піпетка	колба	піпетка	колба	піпетка	колба	клас А	клас В
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1/2	1	25	50					0,16	0,31
		5	10					0,28	0,57
1/5	1	20	100					0,17	0,34
		10	50					0,22	0,45
		2	10					0,36	1,26
1/10	1	25	250					0,13	0,26
		10	100					0,22	0,43
		5	50					0,22	0,45
		1	10					0,63	1,26
1/30	1	15	500					0,20	0,41
1/50	1	10	500					0,20	0,41
		5	250					0,21	0,41
		1	50					0,61	1,22
1/100	1	10	1000					0,20	0,40
		5	500					0,20	0,41
		1	100					0,61	1,21
	2	25	250	25	250			0,18	0,37
	2	5	50	5	50			0,32	0,63
1/125	2	20	250	25	250			0,20	0,41
	2	4	50	5	50			0,35	0,70
1/160	2	25	1000	25	100			0,19	0,38
1/200	1	5	1000					0,20	0,40
	2	25	500	10	100			0,25	0,50
	2	5	100	10	100			0,30	0,61
	2	5	100	5	50			0,31	0,62
1/250	1	1	250					0,60	1,20
	1	2	500					0,30	1,20
	2	10	250	10	100			0,30	0,60
	2	10	250	5	50			0,30	0,61
1/400	2	25	250	25	1000			0,18	0,36
	3	5	50	25	500	10	100	0,34	0,67
	3	5	50	5	100	5	50	0,38	0,77
1/500	1	1	500					0,60	1,20
	2	20	500	25	500			0,20	0,40
	2	2	50	5	100			0,38	1,29
1/1000	1	1	1000					0,60	1,20
	2	20	1000	25	500			0,20	0,40
	2	2	100	5	100			0,38	1,28
1/10000	2	10	1000	1	100			0,64	1,28
	2	5	500	5	500			0,29	0,58
	2	1	100	1	500			0,85	1,71
1/100000	2	10	1000	1	1000			0,63	1,27
	3	5	500	5	500	10	100	0,36	0,72
	3	5	500	5	500	5	50	0,36	0,73
	3	1	100	1	100	5	50	0,88	1,77

Примітка: * – розрахунок проводили, використовуючи вимоги до гранично припустимої помилки для мірного посуду класу А та класу В [8, 9].

ТАБЛИЦЯ 3

Максимальна відносна невизначеність при приготуванні стандартного розчину відповідно до вимог ДФУ

Задана концентрація	Приготування розчинів	Відносна невизначеність в %		
		Маса*	Об'єм**	Загальна
10 г/1000 мл (1%)	10 г/1000 мл	<0,01	0,05	0,05
	1 г/100 мл	0,02	0,12	0,12
	0,5 г/50 мл	0,04	0,17	0,17
	0,25 г/25 мл	0,08	0,23	0,24
	0,1 г/10 мл	0,02	0,50	0,54
1 г/1000 мл (0,1%)	1 г/1000 мл	0,02	0,05	0,05
	0,5 г/500 мл	0,04	0,07	0,08
	0,25 г/250 мл	0,08	0,08	0,11
	100 мг/100 мл	0,20	0,12	0,23
	50 мг/50 мл	0,40	0,17	0,43
	10 мг/10 мл	2,00	0,50	2,06
0,1 г/1000 мл (0,01%)	100 мг/1000 мл	0,20	0,05	0,21
	50 мг/500 мл	0,40	0,07	0,41
	25 мг/250 мл	0,80	0,08	0,80
	10 мг/100 мл	2,00	0,12	2,00
	5 мг/50 мл	4,00	0,17	4,00
	1 мг/10 мл	20,00	0,50	20,00
0,01 г/1000 мл (0,001%)	10 мг/1000 мл	2,00	0,05	2,00
	5 мг/500 мл	4,00	0,07	4,00
	1 мг/100 мл	20,00	0,12	20,00

Примітки: * — для оцінки максимальної відносної невизначеності процедури відважування використовували значення невизначеності 0,2 мг відповідно до вимог ДФУ [92]; ** — для оцінки максимальної відносної невизначеності процедури приготування використовували значення невизначеності мірного посуду відповідно до вимог ДФУ [92].

Зауважимо, що вимоги ДФУ до невизначеності мірного посуду класу А ширші, ніж за стандартом, бо враховують прецизійність при перевірці його метрологічних характеристик [1]. Теоретична оцінка відносної невизначеності приготування стандартного розчину та процесу розведення, враховуючи вимоги ДФУ до гранично припустимої невизначеності вагів та мірного посуду, наведені в табл. 3 і 4.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.

Оцінку невизначеності результатів методик аналізу проводили згідно з ДФУ [1], у межах лінійної моделі:

$$\Delta_Y^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \times \Delta_{X_i}^2$$

Прогнозуєма повна невизначеність результатів аналізу кількісного визначення методом спектрофотометрії з урахуванням основних джерел невизначеності розраховується за формулою:

$\Delta_{As} = \sqrt{(\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2)}$, де Δ_{SP} — невизначеність пробопідготовки (зважування, узяття аліквот та ін.), яка розраховується за вимогами до гранично припустимих похибок для мірного посуду та вагів; Δ_{FAO} — прогнозована невизначеність кінцевої аналітичної операції, яка залежить від точності аналітичного методу. На відміну від Δ_{FAO} фактичне відносне відхилення пробопідготовки Δ_{SP} не може бути знайдена безпосередньо в результаті експериментального дослідження, а тільки шляхом теоретичного розрахунку, спираючись на вимоги нормативної документації до максимально припустимої невизначеності відважування та мірного посуду [1, 2, 10].

Оцінка економічної доцільності використання при аналізі мірного посуду класу В. Щоб дослідити можливість використання при аналізі мірного посуду класу В, ми провели порівняльний аналіз метрологічних характеристик та вартості мірного посуду класу А і В (табл. 5 і 6).

ТАБЛИЦЯ 4

Максимальна відносна невизначеність процесу розведення випробовуваного розчину відповідно до вимог ДФУ

Відношення концентрації	Кількість кроків	Крок 1		Крок 2		Крок 3		Відносна невизначеність
		піпетка	колба	піпетка	колба	піпетка	колба	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1/2	1	25	50					0,43
		5	10					0,78
1/5	1	20	100					0,51
		10	50					0,53
		2	10					0,71
1/10	1	25	250					0,41
		10	100					0,51
		5	50					0,62
		1	10					0,78
1/30	1	15	500					0,70
1/50	1	10	500					0,50
		5	250					0,61
		1	50					0,62
1/100	1	10	1000					0,50
		5	500					0,60
		1	100					0,61
	2	25	250	25	250			0,58
	2	5	50	5	50			0,75
1/125	2	20	250	25	250			0,65
	2	4	50	5	50			0,99
1/160	2	25	1000	25	100			0,58
1/200	1	5	1000					0,60
	2	25	500	10	100			0,65
	2	5	100	10	100			0,80
	2	5	100	5	50			0,87
1/250	1	1	250					0,61
	1	2	500					0,50
	2	10	250	10	100			0,72
	2	10	250	5	50			0,80
1/400	2	25	250	25	1000			0,57
	3	5	50	25	500	10	100	0,90
	3	5	50	5	100	5	50	0,91
1/500	1	1	500					0,60
	2	20	500	25	500			0,65
	2	2	50	5	100			0,81
1/1000	1	1	1000					0,60
	2	20	1000	25	500			0,65
	2	2	100	5	100			0,80
1/10000	2	10	1000	1	100			0,79
	2	5	500	5	500			0,73
	2	1	100	1	500			0,86
1/100000	2	10	1000	1	1000			0,78
	3	5	500	5	500	10	100	1,00
	3	5	500	5	500	5	50	1,06
	3	1	100	1	100	5	50	1,07

Примітка: * – розрахунок проводили, використовуючи вимоги ДФУ до гранично припустимої невизначеності для мірного посуду [92].

ТАБЛИЦЯ 5

Мірні піпетки [iso 835/1]				
Піпетки градувальні на повний злив(чехія)				
Об'єм, мл	Клас а		Клас в	
	± Мл	Вартість, грн	± Мл	Вартість, грн
1	0,006	11,70	0,010	8,62
2	0,010	12,30	0,020	8,93
5	0,030	14,55	0,050	10,35
10	0,050	14,69	0,100	10,05
20	0,100	29,92	0,200	24,08
25	0,100	29,92	0,200	24,23
50	0,200	57,82	0,400	54,67
100	0,200	87,37	0,400	83,39

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведеної оцінки відносної невизначеності відповідно до ДСТУ ISO (табл. 1 і 2) доводять, що при використанні при аналізі мірного посуду класу В невизначеність результатів збільшується вдвічі.

Результати оцінки відносної невизначеності приготування стандартного розчину та процесу розведення, враховуючи вимоги ДФУ до гранично припустимої невизначеності вагів та мірного посуду характеризуються більшою невизначеністю, ніж враховуючи припустимі похибки для мірного посуду відповідно до вимог ДСТУ ISO.

Результати теоретичної оцінки невизначеності приготування стандартних розчинів доводять, що некоректно обрані наважка і мірний посуд можуть збільшувати помилку результатів аналізу в 10, а то й у 20 разів (табл. 1 і 3). При розведенні випробовуваного розчину некоректний вибір порядку розведення і мірно-

го посуду призводить до збільшення помилки втричі (табл. 2 і 4).

Слід зазначити, що максимальна невизначеність приготування стандартного розчину за вимогами стандарту для мірного посуду класу В не перевищує критичні значення невизначеності, яка розрахована на основі вимог ДФУ до невизначеності мірного посуду. При оцінці процесу розведення максимальна невизначеність, розрахована за вимогами стандарту для мірного посуду класу В, перевищує критичні значення невизначеності, яка розрахована на основі вимог ДФУ до невизначеності мірного посуду, тільки у випадку використання мірних піпеток об'ємом 1,00 мл та 2,00 мл.

Але сучасна аналітична практика проведення фармакопейного аналізу виключає можливість використання при проведенні аналізу мірного посуду класу В, тому характеристики невизначеності для нього не визначені [1]. Але можна припустити, що максимальна відносна невизначеність пробопідготовки при використанні мірного посуду класу В буде вдвічі

ТАБЛИЦЯ 6

Мірні колби [ISO 1042:1998]						
Об'єм, мл	(Simax) зі скляною пробкою, термостійке скло				Росія, (ГОСТ 1770-74)	
	Клас А		Клас В		Клас В	
	± мл	вартість, грн	± мл	вартість, грн	± мл	вартість, грн.
5	0,025	65,69	0,050	51,59	0,05	9,60
10	0,025	50,25	0,050	49,94	0,05	9,60
25	0,040	46,35	0,080	42,75	0,08	9,78
50	0,060	46,87	0,120	40,87	0,12	9,90
100	0,100	48,82	0,200	41,85	0,20	10,50
200	0,150	70,79	0,300	67,79	0,30	11,64
250	0,150	73,95	0,300	73,12	0,30	13,50
500	0,250	81,07	0,500	68,02	0,50	18,90
1000	0,400	110,84	0,800	83,69	0,80	42,00
2000	0,600	145,04	1,200	124,57	1,20	53,46

більшою, ніж при використанні мірного посуду класу А. Очевидно, з поганим мірним посудом неможливо отримати точних результатів.

Наведені в табл. 3 і 4 дані дозволяють провести оптимальну пробопідготовку та теоретичну оцінку її максимальної невизначеності з урахуванням умов методики за умови, що мірний посуд, який використовується, відповідає вимогам стандарту і при аналізі здатний забезпечити результати, які прогножуються.

Стосовно економічної доцільності використання при аналізі мірного посуду класу В зауважимо, що вимоги до метрологічних характеристик мірного посуду класу В висуваються вдвічі вищі, ніж для посуду класу А. Але вартість мірного посуду класу А і В виробництва Чехії розрізняється від 31 копійки до 14,00 гривень і лише для мірних колб на 1000 мл і 2000 мл дорівнює 27,00 та 20,00 гривень відповідно. Тобто вартість мірного посуду приблизно однакова. Дуже різниться вартість мірного посуду класу В виробництва Росії в порівнянні з мірним посудом виробництва Чехії.

ВИСНОВКИ

1. Результати оцінки доцільності використання мірного посуду класу В для проведення хімічного контролю свідчать, що при його використанні невизначеність результатів збільшується вдвічі при приблизно однакової вартості з мірним посудом класу А.

2. Розроблено розрахункову таблицю для оцінки невизначеності пробопідготовки за методом стандарту, яка дозволяє провести оптимальну пробопідготовку та теоретичну оцінку її невизначеності з урахуванням особливостей методики за умови, що мірний посуд, який використовується, відповідає вимогам ДФУ і при аналізі здатний забезпечити результати, які прогножуються.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — Доповнення 2. — Харків: РІРЕГ. — 2008. — 608 с.
2. Гризодуб А. И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А.И.Гризодуб // Фармаком. — 2006. — №1/2. — С. 35-44.
3. Дворкин В.И. Метрология и обеспечение качества количественного химического анализа / В.И.Дворкин. — М.: Химия, 2001. — 263 с.
4. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях

- / А.И.Гризодуб, Н.Н.Зволинская, Н.Н.Архипова и др. // Фармаком. — 2004. — №2. — С. 20-34.
5. Євтіфєєва О. А. Застосування методу фотоколориметрії в аналізі лікарських засобів аптечного виготовлення: проблеми та перспективи / О.А.Євтіфєєва, В.А.Георгіянц // Фармац. часопис. — 2010. — №2 — С. 72-77.
 6. Євтіфєєва О.А. Стандартизація підходів до оцінки якості екстемпоральних лікарських засобів: дис. д-ра фарм. наук. — Х., 2011. — 581 с.
 7. Леонтьев Д.А. Метрологический контроль качества результатов измерений / Д.А.Леонтьев, А.И.Гризодуб // Фармаком. — 2007. — №2. — С. 16-25.
 8. Посуд лабораторний скляний. Колби мірні з однією позначкою (ISO 1042:1998, IDT) : ДСТУ ISO 1042:2005. — [Чинний від 2008-01-01]. — К.: Держспоживстандарт України 2008. — V, 10 с. — (Національний стандарт України).
 9. Laboratory glassware. Graduated pipettes. Part 1. General requirements: ISO 835. 1:2007. / International Organization for Standardization, April 2007, Geneva. — 5 p.
 10. Метрология. Поверка средств измерений. Организация и порядок проведения (OIML D 12:2002, IDT): ДСТУ OIML D 12:2007. — [Чинний від 2009-01-07]. — К.: Держспоживстандарт України 2007. — 11 с. — (Національний стандарт України).

О.А.Евтифеева. Теоретическая оценка полной неопределенности пробоподготовки при спектрофотометрическом определении. Харьков, Украина.

Ключевые слова: стандартизація, спектрофотометрический метод анализа, пробоподготовка.

Провели теоретическую оценку полной неопределенности пробоподготовки при спектрофотометрическом количественном определении методом стандарта и анализ факторов, которые на нее влияют. Разработано расчетную таблицу для оценки неопределенности составляющих пробоподготовки по методу стандарта, которая позволяет адаптировать и оптимизировать пробоподготовку в соответствии с задачами анализа.

О.А.Ievtifeieva. Theoretical estimation of complete uncertainty in the spectrophotometric determination of sample preparation. Kharkiv, Ukraine.

Key words: standardization, spectrophotometric analysis, sample preparation.

Theoretical estimation of total uncertainty in sample preparation spectrophotometric method of quantifying the standard and analysis of the factors that affects it. Calculation spreadsheet was made for evaluation of uncertainty components for the sample preparation method standard that allows you to adapt and optimize the sample preparation according to task analysis.

Надійшла до редакції 15.08.2012 р.