

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САМАРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

КАРПОВ АЛЕКСАНДР ВЯЧЕСЛАВОВИЧ

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ
ОЦЕНКИ ОТДЕЛЬНЫХ ЭТАПОВ АНАЛИЗА В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Воронин Александр Васильевич
доктор фармацевтических наук,
доцент

Самара – 2023

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ (обзор литературы).....	14
1.1. Общие подходы к метрологической оценке методик количественного химического анализа.....	14
1.2. Метрологическая аттестация методик количественного химического анализа.....	18
1.3. Статистическая оценка этапов аналитической методики.....	25
1.4. Программное обеспечение для химической метрологии	30
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	32
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
2.1. Объекты исследования	32
2.2. Спектрофотометрический анализ диосмина в лекарственных препаратах ..	32
2.3. Пробоподготовка образцов крови в судебно-химической экспертизе.....	33
2.4. Исследование образцов крови методом УФ-спектрофотометрии.....	33
2.5 Исследование образцов крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием.....	34
2.6. Исследование образцов крови методом тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией.....	35
2.7. Расчет прогнозируемых метрологических характеристик методик количественного определения.	35
2.8. Определение степени извлечения целевых компонентов.....	36
2.9. Математическое планирование пробоподготовки методами твердо-жидкостной и жидкость-жидкостной экстракции.	38
2.10. Статистическая обработка результатов исследования.....	38
ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ (НА ПРИМЕРАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИОСМИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И ВЕРАПАМИЛА В КРОВИ).....	39

3.1. Определение метрологических характеристик методики количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии.....	42
3.2. Определение метрологических характеристик методик количественного определения верапамила в крови, применяемых в судебно-химической экспертизе	49
Выводы по главе 3.....	58
ГЛАВА 4. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ (НА ПРИМЕРАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИОСМИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И ВЕРАПАМИЛА В КРОВИ).....	60
4.1. Статистический анализ метрологических характеристик методики количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии	62
4.2. Статистический анализ метрологических характеристик методик количественного определения верапамила в крови, применяемых в судебно-химической экспертизе.....	69
Выводы по главе 4.....	77
ГЛАВА 5. АЛГОРИТМЫ ОЦЕНКИ ПОГРЕШНОСТИ И ПЛАНИРОВАНИЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ (НА ПРИМЕРАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИОСМИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И ВЕРАПАМИЛА В КРОВИ).....	80
5.1. Алгоритм оценки погрешности и планирования пробоподготовки для методики количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии.....	82
5.2. Алгоритм оценки погрешности и планирования пробоподготовки для методик количественного определения верапамила в крови, применяемых в судебно-химической экспертизе	98
Выводы по главе 5.....	109
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	111
Практические рекомендации.....	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116

ПРИЛОЖЕНИЕ 1	142
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	143
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	149
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	150
ПРИЛОЖЕНИЕ 5	163

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Количественный химический анализ с метрологической точки зрения представляет собой сложное косвенное измерение, для выполнения которого применяется, как правило, несколько измерительных приборов и вспомогательных устройств, осложненное к тому же непосредственным вмешательством человека в процесс измерения, которое часто играет определяющую роль [Дворкин В.И., 2019].

Исследование метрологических характеристик аналитической методики направлено на определение точности путем оценки систематических и случайных влияний на единичные результаты. Традиционно в химической метрологии рассматривают две составляющие точности: правильность и прецизионность. Все более распространенным становится представление точности через единую числовую характеристику – «неопределенность измерения» [Magnusson В., Ornemark U., 2016].

Поиск потенциального источника погрешностей заставляет химика-аналитика оценивать каждый отдельный этап анализа по количеству вносимых ошибок, а в дальнейшем выполнять поиск методов их снижения – параметров оптимизации [Севостьянова Н. Т., Баташев С. А., 2018].

В контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе пробоподготовка считается наиболее сложным этапом аналитического исследования, поскольку она влияет на всю аналитическую методику. В большинстве случаев пробоподготовка представляет собой сложную процедуру, состоящую из нескольких этапов. Она является потенциальным источником ошибок и в итоге определяет либо удовлетворительный результат, либо ставит его под сомнение [Soares da Silva Burato J. et al., 2020; Filippou O. et al., 2017].

Одним из вариантов нивелирования погрешностей аналитической методики является планирование эксперимента – это оптимальное управление экспериментом в условиях неполной информации о механизме процесса. В настоящее время в исследованиях широко применяются методы планирования

эксперимента, которые позволяют с минимальными затратами материальных, временных и человеческих ресурсов получить всю информацию, необходимую для построения адекватных математических моделей исследуемых объектов и процессов [Соболь И.В. и др., 2021; Селезнева Е.В., Юрина Т.А., 2014].

Большое значение для автоматизации аналитического процесса и дальнейшего его управления имеет установление связи между всеми этапами анализа, а также между аналитиком и техническим устройством, которое обеспечивается с помощью компьютерных программ [Шавейко А.И., Олеферович А.В., 2020].

Для задач химической метрологии в РФ доступны ряд программных продуктов – лабораторных систем, например, LabWare LIMS, 1С: LIMS Управление лабораторией предприятия, Lab5725X. Данные системы поддерживают все современные стандарты и протоколы, компании-разработчики предоставляют библиотеки модулей, расширяющих как базовую функциональность, так и специальную, предназначенную для определенной отрасли: контроля качества лекарственных средств, биоаналитических исследований, экотоксикологического контроля [Куцевич В.И., 2022].

Очевидными недостатками данных продуктов являются финансовая и функциональная привязка потребителя к компании-разработчику – данные системы являются платными, ориентированы на крупнопоточные производственные лаборатории, требуют гибкой настройки под текущие задачи лаборатории, а также избыточная функциональность для контроля качества лекарственных средств, судебно-химической экспертизы.

Степень разработанности темы. В ряде работ рассматриваются методические подходы к расчету метрологических характеристик методик количественного определения целевых веществ с использованием статистических оценок [Савкова Е.Н., 2019; Кадис Р.Л., 2008; Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И., 2007]. Однако в них отсутствуют унифицированные для фармацевтического анализа и судебно-химической экспертизы подходы к метрологической оценке вклада и научно обоснованному планированию отдельных этапов анализа. В связи с этим совершенствование и разработка новых алгоритмов метрологической оценки

отдельных этапов анализа, а также автоматизация расчетных процедур, необходимы для повышения качества и доказательности анализа в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе.

Цель исследования. Целью настоящей диссертационной работы является разработка алгоритмов метрологической оценки отдельных этапов анализа в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе на примерах определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в крови.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Сравнительная оценка метрологических характеристик аналитических методик количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии и верапамила в крови методами УФ-спектрофотометрии, газовой хроматографии с масс-селективным детектированием, тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией.
2. Анализ характера зависимости между систематической ошибкой и суммарной ошибкой количественного определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в крови.
3. Обоснование алгоритма оценки систематической ошибки аналитических методик количественного определения диосмина методом УФ-спектрофотометрии и верапамила в крови методами газовой хроматографии с масс-селективным детектированием, тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией.
4. Разработка алгоритма оценки погрешности этапа пробоподготовки для аналитических методик количественного определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в крови.
5. Разработка алгоритма планирования, оптимизации пробоподготовки лекарственных препаратов при определении диосмина и проб крови при определении верапамила.

6. Разработка компьютерной программы для формирования матрицы планирования эксперимента по оптимизации пробоподготовки и ее апробация на методиках количественного определения диосмина в контроле качества лекарственных средств и верапамила в крови в судебно-химической экспертизе.

Научная новизна. В ходе исследования даны сравнительные оценки метрологических характеристик при реализации различных методических подходов к определению и расчету содержания анализируемого вещества для методик количественного анализа с применением спектрофотометрии, газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией.

Разработан алгоритм оценки систематической ошибки аналитических методик при количественном определении целевых веществ методом УФ-спектрофотометрии в лекарственных препаратах, а также в биологических жидкостях методами газовой хроматографии с масс-селективным детектированием, тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией.

Показано, что ошибки на этапе пробоподготовки для аналитических методик количественного определения лекарственных препаратов и аналитов в биологических жидкостях методами твердо-жидкостной и жидкость-жидкостной экстракции вносят значительный вклад в общую погрешность методики.

Впервые обоснован алгоритм теоретической оценки погрешности пробоподготовки в контроле качества лекарственных препаратов и биологических жидкостей в судебно-химической экспертизе. Дана сравнительная оценка метрологических характеристик при реализации различных методических подходов к определению и расчету содержания анализируемого вещества для методик количественного анализа с применением УФ-спектрофотометрии, газовой хроматографии с масс-селективным детектированием, тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией.

Получены математические модели (множественной линейной регрессии) влияния внешних факторов на степень извлечения (экстракции) из пробы целевого

вещества при пробоподготовке методами твердо-жидкостной и жидкость-жидкостной экстракции.

Предложены схемы математического планирования эксперимента, а также пути оптимизации методик количественного определения целевого вещества на примерах анализа лекарственных препаратов, содержащих диосмин, а также биологических жидкостей при судебно-химическом исследовании на верапамил.

Разработана компьютерная программа для ЭВМ «ChemPlan 1.0», которая позволяет формировать матрицу эксперимента в зависимости от количества учитываемых факторов с их трехуровневой градацией (низкий, средний, высокий).

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость результатов исследования заключается в формировании у аналитиков: компетенций в сфере математического планирования эксперимента для различных схем многофакторного анализа, а также методических принципов оценки погрешности отдельных этапов анализа в контроле качества лекарственных препаратов и в судебно-химической экспертизе.

Сформулированные в работе методические принципы являются практическими рекомендациями по разработке методик количественного анализа объектов исследования в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе.

При использовании компьютерной программы для ЭВМ «ChemPlan 1.0» расчетные процедуры планирования и оптимизации автоматизируются, что в дальнейшем в рутинной аналитической практике позволит упростить и ускорить внедрение и совершенствование аналитических методик.

Личный вклад автора. Результаты экспериментальных исследований, представленные в диссертации, получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Автором проведена сравнительная оценка метрологических характеристик методик количественного определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в крови, обоснован алгоритм оценки систематической ошибки указанных аналитических методик, разработан алгоритм оценки погрешности пробоподготовки лекарственных препаратов с диосмином

методом твердо-жидкостной экстракции и пробоподготовки проб крови методом жидкость-жидкостной экстракции, предложен алгоритм планирования и оптимизации пробоподготовки на примерах определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в крови, выполнена статистическая обработка экспериментальных данных, разработана программа для ЭВМ «ChemPlan 1.0».

Связь задач исследования с планом научно-исследовательской работы. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» (№ государственного учета АААА-А19-119051490148-7).

Публикации. Опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 работы в журналах из перечня рецензируемых научных изданий, из них 1 статья опубликована в журнале, индексируемом в международной базе Scopus. Получено 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Издано 1 информационное письмо для химиков-экспертов «Планирование процедуры жидкость-жидкостной экстракции в судебно-химической экспертизе», утвержденное ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России.

Внедрение результатов исследования. Разработанное по результатам исследования информационное письмо «Планирование процедуры жидкость-жидкостной экстракции в судебно-химической экспертизе» издано ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России. Алгоритм с применением математического планирования этапа пробоподготовки при помощи программы «ChemPlan 1.0» апробирован и внедрен в практическую деятельность ООО «Самарская фармацевтическая фабрика» и ООО «Лекарь» (акты внедрения от 27.09.2022 г.), филиала № 3 ФГКУ «111 Главного государственного центра судебно-медицинских и криминалистических экспертиз Минобороны

России» (акт внедрения от 21.10.2022 г.), учебный процесс в Пермской фармацевтической академии (01.12.2022 г.), Курском государственном медицинском университете (акт внедрения от 08.12.2022 г.), Башкирском государственном медицинском университете (акт внедрения от 07.12.2022 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует пп. 3, 4 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Методология и методы исследования. Методологическая основа исследования заключалась в научном поиске и обосновании методических подходов метрологической оценки отдельных этапов анализа в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе.

При выполнении диссертационного исследования были использованы методы: УФ-спектрофотометрии, тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией, газовой хроматографии с масс-селективным детектированием.

Для статистической обработки полученных результатов использовали обработку выборок методами вариационной статистики, регрессионный, корреляционный, однофакторный дисперсионный анализы.

Положения, выдвигаемые на защиту:

- метрологические характеристики аналитических методик количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии, верапамила в крови методами УФ-спектрофотометрии, газовой хроматографии с масс-селективным детектированием, тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией;

- корреляционные зависимости между систематической ошибкой и общей ошибкой определения для методик количественного анализа диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в крови;

- алгоритм оценки систематической ошибки аналитических методик количественного определения диосмина методом УФ-спектрофотометрии и верапамила в крови методами газовой хроматографии с масс-селективным детектированием, тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией;

- алгоритм оценки погрешности этапа пробоподготовки для аналитических методик количественного определения диосмина в контроле качества лекарственных средств в лекарственных препаратах и верапамила в крови в судебно-химической экспертизе;

- компьютерная программа «ChemPlan 1.0» для формирования матрицы эксперимента по планированию и оптимизации пробоподготовки;

- математические модели твердо-жидкостной экстракции диосмина из лекарственных препаратов и жидкость-жидкостной экстракции верапамила из проб крови;

- алгоритмы планирования, оптимизации пробоподготовки лекарственных препаратов при определении диосмина и проб крови при определении верапамила.

Степень достоверности научных положений определяется представительностью и достоверностью первичных аналитических данных; корректностью сбора информации; широким использованием современных физико-химических методов анализа и статистических методов исследования; репрезентативностью выборки; апробацией и подтвержденным внедрением результатов в практику. Для обработки результатов исследований использованы методы статистического анализа данных. Сформулированные в диссертации выводы аргументированы и логически вытекают из результатов анализа и четко аргументированы.

Апробация результатов. Основные результаты работы доложены на следующих конференциях: Международном научном форуме «Наука и инновации – Современные концепции» (Москва, 2020), научно-практической конференции «Современные проблемы химии, технологии и фармации» (Чебоксары, 2020), I Межвузовской научно-практической конференции с международным участием «Синтез наук как основа развития медицинских знаний» (Самара, 2020), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию з.д.н. РФ профессора А.А. Лебедева «Аспирантские чтения – 2020. Молодые ученые: научные исследования и инновации» (Самара, 2020), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием,

посвященной 90-летию з.д.н. РФ профессора А.А. Лебедева «Аспирантские чтения – 2021: молодые ученые - медицине» (Самара, 2021), Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», посвященной 50-летию кафедры токсикологической химии (Пермь, 2022).

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 176 страницах, состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, общих выводов, списка литературы и приложения. Содержит 54 таблицы, 27 рисунков. Список литературы состоит из 184 источников, в том числе 60 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ (обзор литературы)

1.1. Общие подходы к метрологической оценке методик количественного химического анализа

Для обеспечения достоверности аналитического контроля веществ и материалов необходимо разработать общий подход к оценке качества анализа и пригодности его для решения конкретных аналитических задач. Специалисты в области метрологии и аналитической химии оценили возможность включения в процедуру химического анализа специального метрологического раздела с методами математической статистики [105]. Количественный химический анализ как вид измерения имеет ряд особенностей. В отличие от большинства видов метрологических исследований, аналитический сигнал зависит не только от определяемой концентрации, но и от общего состава пробы, компоненты которой влияют, иногда кардинально, на результат анализа [57].

Другое отличие аналитических измерений – отбор и формирование пробы для анализа. Проба должна быть представительной, т.е. отражать состав партии вещества или материала (фармацевтической субстанции, лекарственного препарата, биологического материала и др.), масса которой во много раз превышает массу пробы и при этом может быть неоднородной. Более того, отбор пробы, как правило не входит в функции аналитической лаборатории, проводится или непосредственно в процессе производства, или специальными службами [38].

Таким образом, один из главных видов анализа – аналитический контроль – базируется на триаде «производство – пробоотбор – анализ». Результат аналитического контроля выдает лаборатория, он включает погрешность (неопределенность) процедуры пробоотбора, которая может существенно превышать погрешность для собственно химического анализа. Учитывая, что сама аналитическая лаборатория пробоотбор не проводит, перед проведением анализа она должна получить информацию о том, каким образом представленный образец

был получен и каким образом установлена его представительность. Проблема метрологии пробоотбора чаще всего относят к числу нерешенных [86].

Главная особенность количественного анализа как вида измерений – необходимость с учетом его особенностей для получения результата иметь методики анализа для любых конкретных видов веществ и объектов со специальным метрологическим разделом. Без методики анализа даже при наличии современного аналитического оборудования невозможно получить достоверные результаты количественного химического анализа [56].

Существует мнение, что метрологические аспекты количественного анализа всесторонне исследованы и необходимо просто использовать разработанный формализм в рутинной практике анализа. Однако, разработаны лишь общие подходы к метрологии анализа, узаконены – терминология, требования к методикам и другие нормативные характеристики. Следует понимать, что способы обеспечения достоверности, учет индивидуальных особенностей каждого объекта анализа, исследование бюджета неопределенности результата анализа и ряд других положений до сих пор часто входят в число нерешенных задач [96].

Наиболее сложной и важной составляющей разработки методики анализа является оценка ее метрологических характеристик, требующая специальных экспериментальных и теоретических исследований, а также учета специфики объекта анализа – фармацевтических субстанций, многокомпонентных объектов: лекарственных препаратов, лекарственного растительного сырья, биологического материала [28].



Рисунок 1 – Структура погрешности в количественном химическом анализе

В свою очередь методика измерений – совокупность операций и правил, выполнение которых обеспечивает получение результата анализа с установленными показателями качества, к которым относится погрешность и неопределенность [113]. Показатели качества методики анализа – значения неопределенности или приписанной характеристики погрешности методики анализа и составляющих неопределенности или характеристики погрешности. К показателям качества методики анализа относят показатели точности, правильности, воспроизводимости, прецизионности, а также, при необходимости, другие показатели, характеризующие составляющие бюджета неопределенности или погрешности измерений, получаемых по методике анализа [82].

Точность – степень близости результата измерений к принятому опорному значению. Понятие «точность измерений» описывает качество измерений в целом, объединяя понятия правильность и прецизионность измерений.

Правильность – степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений (или результатов испытаний), к принятому опорному значению. Мету правильности обычно выражают в терминах систематическая погрешность или смещение [95].

Смещение – разность между математическим ожиданием результатов измерений (наблюдений) и принятым опорным значением. Смещение является общей систематической погрешностью.

Систематическая погрешность – разность между математическим ожиданием результатов измерений и истинным или принятым опорным значением [46].

Прецизионность – степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях. Прецизионность зависит от распределения случайных ошибок и не связана ни с истинным, ни с заданным значениями. Меру прецизионности обычно выражают в терминах рассеяния и вычисляют как стандартное отклонение результатов наблюдений. Малой прецизионности соответствует большое стандартное отклонение. Независимость результатов наблюдений означает, что результаты получены таким образом, что отсутствует влияние предыдущих результатов на том же самом или аналогичном объекте наблюдений. Количественные меры прецизионности решающим образом зависят от принятых условий. Понятие «прецизионность измерений» используется для определения понятий повторяемости измерений, внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности измерений и воспроизводимости измерений [30].

Воспроизводимость – прецизионность в условиях воспроизводимости. Условия воспроизводимости – условия, при которых результаты измерений получают одним и тем же методом, на идентичных объектах испытаний, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования. Воспроизводимость результатов измерений – степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости – одним и тем же методом на идентичных объектах, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования [90].

Погрешность (результата измерения или анализа) – разность между измеренным значением величины и опорным значением величины. Погрешность измерения складывается из случайной и систематической погрешностей [6,40].

Все большее акцентирование в данном разделе описания методов измерения уходит на неопределенность результатов, полученных используемыми методами [110]. Неопределенность – неотрицательный параметр, характеризующий рассеяние значений величины, приписываемых измеряемой величине на основании

измерительной информации. Неопределенность измерений включает в себя в общем случае несколько составляющих. Некоторые из этих составляющих могут быть оценены по статистическим распределениям результатов серии измерений и охарактеризованы экспериментальным стандартным отклонением. Другие составляющие, которые также могут быть охарактеризованы стандартными отклонениями, оцениваются на основе предположений о распределении вероятностей, основанных на экспериментальной или другой информации [54].

1.2. Метрологическая аттестация методик количественного химического анализа

В фармацевтическом анализе и судебно-химической экспертизе приоритет принадлежит инструментальным методам хроматографического анализа, реже используется метод тонкослойной хроматографии. Перечисленные методы характеризуют физико-химические свойства веществ, которые являются постоянными величинами, но так как анализ проводится в различных условиях, на различном оборудовании сравнить результаты невозможно. Именно для прослеживаемости и сравнимости результатов анализа, проводимых на разном оборудовании, разными операторами в различающихся условиях необходимо использовать стандартные образцы в качестве критерия сравнения результатов анализа. Только в таком случае можно говорить об единстве измерений и прослеживаемости результатов анализа [84].

Базовый международный стандарт ISO Guide30: 2015 дает общее определение стандартному образцу – это вещество, достаточно однородное и стабильное по отношению к одному или нескольким определенным свойствам, для того чтобы использовать его в соответствии с назначением в измерительном процессе [163].

Стандартные образцы используют в качестве «эталонов» при идентификации веществ, для градуировки аналитических приборов при проведении количественного анализа, валидации методик и контроля качества результатов измерений. Таким образом, стандартный образец – это вещество с точно

установленным показателем (который называется «аттестованным показателем») [10].

Классификация стандартных образцов:

- по характеру нормируемой величины – стандартные образцы состава, стандартные образцы свойств;

- по назначению – для качественного анализа, для количественного анализа;

- по ISO Guide 30 – стандартные образцы (RM), сертифицированные (аттестованные) стандартные образцы (CRM); первичные стандартные образцы, вторичные стандартные образцы;

- по отраслевой принадлежности – фармацевтические стандартные образцы, фитостандарты, стандарты для экологического контроля и т.д.;

- по области использования – международные, национальные (государственные), отраслевые, стандартные образцы предприятия [35].

Например, сертифицированный (аттестованный) стандартный образец (CRM), в отличие от стандартного образца (RM) имеет точно установленное аттестованное значение; аттестованное значение установлено в лаборатории, аккредитованной по ИСО 17025; значение приведено с неопределенностью; значение имеет метрологическую прослеживаемость к эталонам; обязательно сопровождается паспортом. Кроме того, производитель CRM должен подтвердить свою компетентность путем аккредитации по стандарту ISO Guide 34 [36].

В сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений применяются стандартные образцы утвержденных типов. Для применения в сферах, относящихся к «области государственного регулирования» должны применяться аттестованные стандартные образцы, признанные государством – государственные стандартные образцы (ГСО) [116].

Для применения в сферах, не относящихся к области государственного регулирования, предприятия могут решать самостоятельно, какие стандартные образцы использовать: государственные, отраслевые или стандартные образцы предприятия. Следует отметить что, любой ГОСТ на территории РФ доброволен к применению. Надо учитывать, что присутствует сильная отраслевая специфика и

регуляторные органы устанавливают свои требования к использованию стандартных образцов.

Отечественные производители выпускают в основном стандарты ранга ГСО, используемые для работы в области государственного регулирования обеспечения единства измерений. Стандартных образцов ранга RM производится существенно меньше.

Выпуск и аттестация ГСО требует больших затрат и сроков. Этим объясняется небольшой по объему перечень стандартных образцов органических соединений, производимых отечественными предприятиями. При этом в РФ есть научно-техническая база для создания стандартных образцов органических соединений ранга CRM, например, лаборатории Уральского НИИ метрологии [111].

Отечественных фармацевтических стандартных образцов в настоящее время нет. Поэтому приходится использовать стандартные образцы (CRM) фармакопей Европы (EP) и США (USP) [84].

При этом понятно, что применение и первичных (международных) стандартных образцов и фармакопейных стандартных образцов весьма дорогостоящее мероприятие, существенно влияющее на целевой продукт. В этой связи в фармацевтической отрасли согласно требованиям надлежащей производственной практики (GMP) с успехом применяется двухуровневая система стандартных образцов:

1) Фармакопейный СО (ФСО): СО, аттестованный, введенный в действие и распространяемый фармакопейным органом для контроля качества ЛС (т.е. по процедуре как для отраслевого СО). ФСО используется для проведения арбитражных анализов и для калибровки вторичных СО предприятия (ВСО). ФСО формально признается как первичный СО, который стоит в начале цепочки измерений [88].

2) Вторичный СО предприятия (ВСО): используется для проведения рутинных анализов, обязательно должен быть откалиброван по ФСО (т.е. это обязательно вторичный СО). ВСО имеет статус СО предприятия.

Для некоторых соединений стандартных образцов, аттестованные уполномоченным фармакопейным органом вообще отсутствуют. При их отсутствии для идентификации и оценки содержания действующего вещества должны использоваться первичные стандартные образцы. Первичные стандартные образцы могут быть различного ранга: CRM, RM, ГСО, стандартные образцы предприятия [78,108].

Корректно аттестованные первичные СО являются дорогими для рутинного контроля даже для фармацевтических компаний, которые сами аттестуют их для инновационных препаратов. Крупные фармацевтические предприятия создают специализированные центры, предназначением которых являются аттестация первичных СО для оригинальных препаратов и калибровка по ним ВСО для обеспечения рутинных анализов. Таким образом соблюдается принцип прослеживаемости результатов анализа [64].

Если нужного стандартного образца нет среди коммерческих первичных стандартов, остается единственный вариант – аттестовывать первичный стандартный образец предприятия и использовать его для контроля качества продукции [66].

Для проведения качественного и количественного анализа в первую очередь необходимо соответствующее метрологическое обеспечение – цикл мероприятий, правил, действий, наличие материалов, использование устройств, направленных на получение достоверных, правильных, точных и воспроизводимых результатов измерений, по которым можно судить о показателях, включая показатели качества и показатели безопасности продукции [111].

Основными документами по данному вопросу являются ГОСТ Р 8.563-2009 «ГСИ. Методики (методы) измерений» и Р 50.2.090-2013 «ГСИ. Методики количественного химического анализа. Общие требования к разработке, аттестации и применению» [33].

Оценка метрологических характеристик методик количественного определения в фармацевтическом анализе в настоящий момент сводится к охарактеризованности методики методами математической статистики. При чем

при разработке новых и модернизации уже имеющих методик гораздо большее внимание уделяется процедуре математической обработки результатов химического анализа. При этом собственно методике проведения определения отводится второстепенное место [22].

В фармацевтическом анализе для установления соответствия качества ЛС регламентируемым нормам предполагается применение различных аналитических методов. Процесс лабораторного изучения степени пригодности аналитических методов получил название «валидация» (validation) [5,11,92,124,129,133,136,140,141,142,144,146,148,151,165,170,177,178,181,182,183, 184]. В Государственную Фармакопею XIV издания включена ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Согласно данной ОФС валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач. Статья регламентирует характеристики аналитических методик, определяемые с целью их валидации, и соответствующие критерии пригодности валидируемых методик, предназначенных для контроля качества лекарственных средств: фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов [69,117].

Оценка аналитической методики при валидации проводится по перечисленным характеристикам, выбираемым с учетом типовых рекомендаций, а именно:

- специфичности (specificity);
- пределу обнаружения (detection limit);
- пределу количественного определения (quantitation limit);
- аналитической области (range);
- линейности (linearity);
- правильности (trueness);
- прецизионности (precision);
- устойчивости (robustness) [122].

Стоит отметить, что термин «валидация» часто путают с термином «верификация», что встречалось в ряде работ, например, в [18]. Отличие данных терминов в том, что верификацию проводят с целью проверки соответствия качества продукции установленным требованиям и предупреждения запуска в производство или эксплуатацию несоответствующей продукции [8,34]. Иными словами, верификация вводится для обозначения процедуры, которую должна выполнить лаборатория чтобы использовать стандартные методики, прежде чем приступить к испытаниям, а именно иметь оборудование, квалифицированный персонал и др. [75]. Верификация является обязательной процедурой перед введением в рутинную эксплуатацию новых приборов [19].

Для того чтобы результаты аналитических измерений удовлетворяли требованиям нормативной документации, необходимо обеспечить соблюдение норм и требований, регламентирующих использование средств измерений, вспомогательного и испытательного оборудования [55]. В том числе контроль метрологического обеспечения выражается в аттестации разрабатываемых и применяемых методик анализа [48].

Аттестацию методик измерений, применяемых в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений, проводят аккредитованные в установленном порядке в области обеспечения единства измерений юридические лица и индивидуальные предприниматели, в том числе государственные научные метрологические институты и государственные региональные центры метрологии. При аттестации методик измерений проводят исследование и подтверждение соответствия:

- методик измерений – их целевому назначению, т.е. соответствие предлагаемой методики свойствам объекта измерений и характеру измеряемых величин;
- условий выполнения измерений – требованиям к применению данной методики измерений;
- показателей точности результатов измерений и способов обеспечения достоверности измерений – установленным метрологическим требованиям;

- используемых в составе методики измерений средств измерений, стандартных образцов – условиям обеспечения прослеживаемости результатов измерений к государственным первичным эталонам единиц величин, а в случае отсутствия соответствующих государственных первичных эталонов единиц величин – к национальным эталонам единиц величин иностранных государств;
- записи результатов измерений – требованиям к единицам величин, допущенным к применению в Российской Федерации;
- форм представления результатов измерений – метрологическим требованиям [39].

Однако в настоящее время для проведения судебно-химической экспертизы отсутствует узконаправленная нормативная база, но разработанные в рамках этой деятельности методики также требуют проведения процедур аттестации для определения соответствующих метрологических параметров, валидации методик и установления процедур контроля стабильности результатов судебно-химической экспертизы [12,39,72].

Основным вариантом метрологической экспертизы аналитических методик в РФ для судебно-химической экспертизы и химико-токсикологического анализа является валидация [29,112]. «Руководство по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала» носит рекомендательный характер, при этом не исключает возможность аттестации методик с включением в Реестр МВИ Росстандарта [85].

Для метрологического обеспечения судебно-химических и химико-токсикологических исследований также, как и в фармацевтическом анализе используются стандарты: ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002, ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006, которые обеспечивают получение достоверных, правильных, точных и воспроизводимых результатов экспертных исследований [39,42,43]. Данные документы хоть и рекомендуют достаточно большой набор способов контроля качества результатов исследований, приемлемых в судебно-химической экспертизе, однако являются не целевыми для них.

Также требуется обоснование возможности применения контрольных карт для контроля стабильности результатов химико-токсикологического анализа на основе компьютерных программ, позволяющих полностью или частично автоматизировать внутрилабораторный контроль [39,94,109]. Стандартизация и контроль на всех этапах – залог получения достоверных и воспроизводимых результатов судебно-химического исследования [39,52].

1.3. Статистическая оценка этапов аналитической методики

Жизненный цикл аналитического процесса охватывает этапы от постановки задачи химического анализа до ее реализации. На первом этапе необходимо четкое понимание и документирование требований со стороны заказчика, наличие ресурсов, наличие методов, устранение всех неясностей и непонимания до начала работ [37].

Погрешности в химическом анализе встречаются на всех этапах его процесса от пробоотбора до получения аналитического сигнала измерительным прибором. Так, измерение рассматривается как последовательность трех основных этапов - отбора проб, пробоподготовки, преаналитического, аналитического, постаналитического анализа (или подготовки к испытаниям, проведения испытаний, обработки и анализа результатов), на протяжении которых объект претерпевает изменения, переходя из одного состояния в другое, от целевого объекта до лабораторной пробы, предоставляя возможность получения измерительной информации и одновременно факт ее неизбежных потерь [76,99,115].

Особое внимание уделяется вкладу в неопределенность анализа стадии пробоотбора. Чтобы этот этап не искажал значимо конечный результат, процедура пробоотбора должна быть детально описана и метрологически оценена. Важен принцип выбора аналитического метода, который опирается на: вид пробы, матрицу и измеряемую величину; используемое оборудование; пределы обнаружения и границы определяемых содержаний; селективность; потенциальные метрологические характеристики; продолжительность; стоимость

и др. Обобщены подходы к валидации или аттестации методик и/или ее верификации в зависимости от задач, связанных с разработкой нестандартной методики или модификацией стандартизированной методики [8].

Показано, что основой валидации методик химического анализа является оценка неопределенности. Отмечено, что это не только формализованная процедура, но и методически грамотное сопровождение научно-исследовательского процесса разработки метода анализа в части очистки аналитического сигнала, способов выявления и устранения источников его искажения, выбора подходов к построению градуировочных зависимостей, стандартных образцов [8].

Характер применяемого в методике аналитического сигнала оказывает значительное влияние на точностные характеристики методики количественного определения [2,17,53]. Например, сравнение обычного и модифицированного вариантов способа внешнего стандарта в газохроматографических исследованиях показывает, что замена абсолютных значений площадей пиков отношениями площадей пиков целевого аналита и растворителя не влияет на характеристики точности определений по критерию «введено-найдено», но уменьшает случайную составляющую погрешности определений в 2-3 раза. Обсуждается проблема повышения подобных статистических оценок, для чего представляется целесообразным изменение «дизайна» экспериментальных операций. Вместо последовательных анализов однотипных образцов предпочтительнее использовать параллельные определения [113].

Показана принципиальная возможность количественного извлечения ряда лекарственных веществ из водных матриц с применением высаливания. Установлены закономерности высаливания изученных веществ из водных растворов [67,83,119].

В частности, высаливающая способность солей резко увеличивается с увеличением заряда аниона соли. Значительное влияние на эффект высаливания оказывает природа экстрагируемого соединения. Так показано, что в гексан могут быть количественно извлечены следующие соединения: кодеин, модафинил,

афрафинил. Фенобарбитал и псевдоэфедрин ввиду их высокой гидрофильности количественно не извлекаются гексаном даже при концентрации соли близкой к насыщению. Для экстракции фенобарбитала и псевдоэфедрина использован более активный, но менее селективный хлороформ. На основании полученных величин констант распределения веществ и их кислотно-основных свойств предложены экстракционные методики пробоподготовки различных объектов при определении в них изученных веществ с использованием высаливания [86].

Например, при переводе пробы в удобную для анализа форму используют следующие операции: экстракция, флотация, магнитная сепарация и т.п. Каждая из операций может сопровождаться потерей аналита, поскольку ни один из методов разделения не обеспечивает полного выделения и не гарантирует абсолютной чистоты отдельных фракций по отдельным компонентам. Погрешности, сопровождающие операции разделения, могут занижать или завышать конечный результат [32,70,81].

Далее аналитик получает аналитическую форму определяемого компонента, например, добавляются специфические реагенты (осадители, комплексообразователи, восстановители, окислители и т.д.) Данный этап также отягощен погрешностями, которые возникают вследствие неполного образования аналитической формы, образования похожих соединений других компонентов матрицы пробы и прочих процессов [23,31,123].

В процессе измерения аналитического сигнала погрешности вызываются несовершенством измерительных систем и обусловлены помехами, возникающими в процессе формирования, передачи и регистрации сигнала [24,74,80].

Для построения градуировочной зависимости аналитики часто пользуются растворами, приготовленными на основе стандартных образцов или химически чистыми веществами. Поэтому получение результатов анализа с использованием такого градуировочного графика сопровождается разнообразными погрешностями, вызванными межкомпонентным влиянием, матричным эффектом и рядом других факторов всех предшествующих стадий анализа [51,73,89].

Получив результат измерения содержания определяемого компонента, необходимо дать оценку его надежности: рассчитывают доверительный интервал (интервальная оценка погрешности) при заданной вероятности. Кроме этого, необходимо указывать кратность определений и характер оценки погрешности (погрешность единичного результата, погрешность среднего значения, погрешность метода). Если имеется возможность объективной оценки систематической погрешности, то необходимо оценить правильность выполненного анализа. Последний этап подразумевает сопоставление как самого результата, так и значений полученных критериев надежности анализа с требованиями, сформулированными при постановке исходной задачи [68].

Этапом, который вносит значительный вклад в погрешность процедуры анализа является пробоподготовка. Пробоподготовка является одним из самых трудоемких и длительных этапов, который значительно влияет на надежность и точность определения того или иного вещества [13,77,164].

Количественное определение низких концентраций лекарственных веществ и их метаболитов является сложной задачей для химиков-аналитиков в области биомедицинского и фармацевтического анализа из-за мешающих эндогенных соединений и соэкстрактивных веществ, находящихся в анализируемой пробе [4,61].

Поэтому поиск эффективных, хорошо воспроизводимых методов в современной химико-токсикологической лабораторной диагностике очень важен [16]. В то же время пробоподготовка – это стадия риска потерять анализируемое вещество и объект. Поэтому нелишне помнить о необходимости строгих и логически оправданных действий, направленных на сохранение образцов, отобранных для анализа, для дальнейшего исследования [63,179].

Текущие тенденции в подготовке проб включают переход к более «зеленым» подходам за счет сокращения масштабов аналитических операций, миниатюризации инструментов и интеграции новых передовых материалов в качестве сорбентов. Сочетание этих новых материалов с технологиями микроэкстракции на основе сорбентов позволяет разработать

высокопроизводительные методы пробоподготовки, которые улучшают традиционные процедуры экстракции и очистки [125,150,167,168,171,175].

Методы «зеленой» экстракции (GreET) появились в последнее десятилетие как более экологичная и устойчивая альтернатива классическим процедурам пробоподготовки, направленная на повышение селективности и чувствительности аналитических методов, одновременно уменьшая вредные побочные эффекты классических методов экстракции (SET) как для оператора, так и для окружения [126,129,130,131,132,134,135,137,138,139,147,149,153,154,156,157,158,160,162,176,180,185].

Внедрение усовершенствованных процессов, которые преодолевают основные ограничения классических методов с точки зрения эффективности и способности свести к минимуму или исключить использование и образование вредных веществ, будет способствовать более эффективному использованию энергии и ресурсов в тесной связи с принципами, поддерживающими концепцию экологичности [155].

В настоящее время в экспериментальных исследованиях широко применяются методы планирования эксперимента, которые позволяют с минимальными затратами материальных, временных и людских ресурсов получить всю информацию, необходимую для построения адекватных математических моделей исследуемых объектов [104].

Планирование эксперимента — это оптимальное управление экспериментом в условиях неполной информации о механизме процесса. Развитие концепции планирования эксперимента связано с работами английского статистика Р. Фишера. В концепции Фишера главная цель планирования эксперимента состоит в отдельной оценке эффектов в многофакторной ситуации [107].

Широко применяемое в настоящее время планирование эксперимента при поиске оптимальных условий процесса связано с работой американских ученых Бокса и Уилсона, предложивших последовательную стратегию решения экстремальных задач. Работы Бокса и его школы нашли широкое применение в

практике. Одновременно с эмпирико-интуитивным подходом Бокса стало развиваться чисто теоретическое направление в планировании эксперимента [7].

Планирование экспериментальных исследований осуществлено с целью сокращения количества экспериментов и удешевления экспериментальных исследований. Использование в работе плана Бокса-Бенкена позволило сократить количество испытаний с 81 до 27 [78,172].

1.4. Программное обеспечение для химической метрологии

Методы оптимизации представляют собой аналитические инструменты, доступные исследователю в его поиске наилучшего возможного решения конкретной проблемы. Были разработаны методологии для структурирования типичных проблем в структуре фармацевтической разработки, посредством которой сложные математические методы могут использоваться для достижения оптимального решения [49,65,106,124,152,173,174].

В современной химии актуально решение проблемы автоматизации методов анализа. Необходимость как минимум частичной автоматизации аналитического процесса непосредственно связана с непрерывно увеличивающейся необходимостью выполнения большого числа рутинных анализов в самых разных сферах деятельности человечества – производственных, экологических, медицинских, криминалистических и др [1].

Вследствие постоянного усовершенствования техники появляются все новые специализированные устройства, способные заменить человека на всех этапах химического анализа. Большое значение для автоматизации аналитического процесса и дальнейшего его управления имеет установление связи между всеми этапами анализа, а также между химиком и техническим устройством, которое обеспечивается с помощью компьютерных программ [120].

Развитие компьютерной техники и информационных технологий оказывает существенное влияние на все отрасли науки. На сегодняшний день уже имеются работы, посвященные использованию в том числе нейросетевых технологий для прогноза и оптимизации стадии предварительного эксперимента при разработке

новых методик химического анализа на примере проточно-инжекционной спектрофотометрии [93].

Решать задачи автоматизации деятельности лаборатории призваны LIMS2 (Laboratory Information Management System – система управления лабораторной информацией). Современные LIMS – это информационная технология, предназначенная для получения достоверной информации по результатам испытаний и позволяющая оптимизировать все аспекты управления деятельностью лаборатории. Сейчас на рынке предлагается много LIMS-продуктов, например LabWare LIMS, 1C: LIMS Управление лабораторией предприятия, Lab5725X. Данные программные продукты позволяют соответствовать требованиям к качеству установленными ISO 9000 [21, 50].

На основании анализа общих подходов и особенностей для направлений контроля качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизы показано, что разработка алгоритмов оценки погрешности (ошибки) методики, выявление взаимосвязей между суммарной и систематическими погрешностями, количественная оценка вклада отдельных этапов процедуры анализа, в частности, в пробоподготовки, в суммарную погрешность методики, являются актуальными направлениями научных исследований в рамках научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Планирование, оптимизация пробоподготовки лекарственных препаратов, биологического материала при разработке аналитических методик требует от химиков-аналитиков реализации математического планирования многофакторных экспериментов, у большинства разработчиков методик в области контроля качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизы данная компетенция отсутствует.

Таким образом, разработка алгоритмов метрологической оценки отдельных этапов анализа в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе на примере конкретных аналитических методик является актуальной задачей фармацевтической науки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись следующие методики:

– методика количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии [145];

– методики количественного определения верапамила в крови, применяемых в судебно-химической экспертизе: УФ-спектрофотометрия [121], газовая хроматография с масс-селективным детектированием [27], ТСХ с компьютерной денситометрией [24];

В качестве образцов сравнения использовали:

– лекарственные препараты: «Детралекс®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 1000 мг, «Детралекс®» суспензия 1000 мг/10 мл, «Венарус®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 900 мг, «Детравенол®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 1000 мг, «Флебавен®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 1000 мг, «Флебофа®» таблетки 600 мг, «Флебодиа®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 600 мг.

– стандартный образец диосмина («Hyderabad», Индия) (CRM);

– стандартный образец верапамила (в форме гидрохлорида) (LGC Standards, Великобритания);

– модельные образцы крови с содержанием верапамила 500,0–5000,0 нг/мл, для УФ-спектрофотометрической методики – 1,0-200,0 мкг/мл.

2.2. Спектрофотометрический анализ диосмина в лекарственных препаратах

Для количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии применяли известную методику [145].

Пробоподготовка. Таблетки лекарственных препаратов, содержащих диосмин, помещали в ступку и измельчали до однородной порошковой массы. Точную навеску (1,0-1,5 г) измельченной массы помещали в мерную колбу

вместимостью 250 мл, растворяли в растворе натрия гидроксида концентрации 0,02 моль/л и доводили до метки этим же растворителем, перемешивали. 1 мл приготовленного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводили раствором натрия гидроксида 0,02 моль/л до метки, перемешивали.

Для определения градуировочной зависимости готовили растворы диосмина в диапазонах концентраций 0,0002-0,002% и 0,0003-0,003%. Измерение оптической плотности испытуемых растворов осуществляли в при аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм на спектрофотометре СФ-56 в кюветах с длиной рабочего слоя 1 см. Раствор сравнения – раствор натрия гидроксида концентрации 0,02 моль/л [145].

2.3. Пробоподготовка образцов крови в судебно-химической экспертизе

Модельные образцы крови готовили путем добавления расчетного количества стандартного образца (в виде метанольного раствора концентрации 10,0 мкг/мл в пересчете на основание) к образцам трупной крови лиц, умерших от механической травмы, не содержащим наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ. Образцы крови не консервировали, хранили при температуре +4°C.

Концентрация верапамила в пробах крови составляла 500,0-5000,0 нг/мл.

Пробоподготовку образцов крови осуществляли жидкость-жидкостной экстракцией [27,161]. Объем пробы крови составлял 10 мл. Экстракцию верапамила осуществляли хлороформом при рН 9-11. Экстракцию проводили 10 мл экстрагента в течение 5 мин, операцию повторяли дважды с 5 мл экстрагента. Полученные экстракты упаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха при температуре не более 40°C. Сухой остаток растворяли в 50 мкл смеси хлороформ-этанол (1:1).

2.4. Исследование образцов крови методом УФ-спектрофотометрии

При исследовании методом УФ-спектрофотометрии при жидкость-жидкостной экстракции увеличивали объем пробы крови до 50 мл, далее из аликвоты

полученного хлороформного экстракта объемом 20 мл проводили реэкстракцию раствором кислоты хлористоводородной концентрации 0,1 моль/л.

Регистрировали спектр поглощения, полученного реэкстракта в интервале длин волн 200-400 нм. Условия измерения: регистрирующий спектрофотометр СФ-56; шаг измерения – 1 нм; толщина рабочего слоя – 1 см; раствор сравнения – реэкстракт из «холостой» пробы крови, полученный в аналогичных условиях пробоподготовки [58,121].

2.5 Исследование образцов крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием

Исследование полученных в пункте 2.3 экстрактов осуществляли на газовом хроматографе Agilent Technologies 6890 с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5973N с использованием кварцевой капиллярной колонки HP5-MS (5% фенилдиметилсилоксан) длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм с толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Режим программирования температуры колонки: начальная температура 170°C (выдержка в течение 1 мин), повышение температуры со скоростью 15°C/мин до 280°C с выдержкой при конечной температуре 5 мин. В качестве газа-носителя использовали гелий; скорость газа-носителя – 1 мл/мин в режиме постоянного потока. Температура инжектора – 280°C, температура аналитического интерфейса – 285°C. Ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера в режиме без деления потока со сбросом избытка через 1 мин в отношении потоков 1:15 (split/splitless); объем пробы – 1 мкл [29].

При хромато-масс-спектрометрическом анализе регистрировали характеристические ионы верапамила – 151, 260, 303 (режим селективного ионного мониторинга).

Количественное определение осуществляли методом внутреннего стандарта. Диапазон концентраций верапамила составлял 50,0-5000,0 нг/мл; внутренний стандарт – метанольный раствор дифениламина 200,0 нг/мл.

2.6. Исследование образцов крови методом тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией

Пробу экстракта из п. 2.3. объемом 50 мкл наносили микрошприцем на пластины для ТСХ «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» размером 10 × 15 см в виде полосы толщиной не более 1 мм и шириной не более 0,5 см, при нанесении зону первичной адсорбции высушивали теплым воздухом. В качестве систем растворителей (подвижных фаз) использовали смеси этилацетат – метанол – аммиак 25 % (17 : 2 : 1), а также метанол – аммиак 25 % (100 : 1,5). Насыщение камеры парами растворителей проводили в течение 30 мин. Детектирование хроматограмм производили обработкой реактивом Драгендорфа, а также в УФ-свете при длине волны 254 нм. При денситометрическом определении полученные хроматограммы фиксировали путем сканирования с оптическим разрешением 900 dpi в True Color режиме на планшетном сканере, сохраняли в виде файлов с расширением jpeg и обрабатывали с использованием программы «ТСХ-менеджер 4.0» [24].

2.7. Расчет прогнозируемых метрологических характеристик методик количественного определения.

Расчет теоретической величины предела сходимости RSD_r исследуемых методик количественного определения осуществляли по уравнению Горвица [166]:

$$RSD_r = 0,67 \cdot RSD_R;$$

$$RSD_R = 2^{1-0,5 \cdot \log C};$$

$$C = w/100;$$

где w – концентрация анализируемого вещества в пробе, %(мас.); RSD_R – предел воспроизводимости, %; C – коэффициент концентрации.

Расчет теоретических величин стандартного отклонения $S_{сред}$ и относительной ошибки среднего значения $\varepsilon_{сред}$ исходя из величины предела сходимости RSD_r методики осуществляли по формулам:

$$S_{сред} = (RSD_r \cdot x_{сред}) / 100;$$

$$\Delta x = S_{сред} \cdot t(P, f);$$

$$\varepsilon_{сред} = (\Delta x / x_{сред}) \cdot 100 ,$$

где $x_{\text{сред}}$ – среднее значение содержания анализируемого вещества в пробе; $t(P, f)$ – критерий Стьюдента; Δx – полуширина доверительного интервала среднего значения содержания анализируемого вещества.

Расчет относительной ошибки (погрешности) $\varepsilon_{\text{сред}}$ методики количественного анализа диосмина и верапамила в крови осуществляли по формуле:

$$\varepsilon = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{x1}}{x1}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{x2}}{x2}\right)^2 \dots + \left(\frac{\sigma_{xn}}{xn}\right)^2};$$

где $\sigma_{x1}, \sigma_{x2}, \sigma_{xn}$ – значения абсолютных ошибок измерений отдельных этапов методики количественного определения;

x_1, x_2, x_n – значения измеряемых величин при реализации методики количественного определения [26].

2.8. Определение степени извлечения целевых компонентов

Эффективность метода определялась степенью извлечения (СИ, %) целевого вещества из пробы. СИ определяли путем сравнения аналитических сигналов оптической плотности для диосмина и площади хроматографического пика для верапамила.

В методе количественного определения диосмина методом УФ-спектрофотометрии – значения оптической плотности при ее измерении на аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм для двух различных серий образцов после твердо-жидкостной экстракции диосмина из лекарственных препаратов. Серию образцов №1 составили экстракты из холостых проб раствора натрия гидроксида концентрации 0,2 моль/л, в которые перед экстракцией добавлен диосмин в диапазонах концентраций 0,0002-0,002% и 0,0003-0,003%. Серию образцов №2 составили аналогичные экстракты из холостых проб, в которые диосмин был добавлен после процедуры экстракции [24].

Холостые пробы для лекарственных препаратов имели состав:

– «Детралекс®» суспензия: 1000 мг/10 мл: кислота лимонная 12,5 мг, ароматизатор апельсиновый 15,0 мг, мальтитол 1800,0 мг, натрия бензоат 15,0 мг, ксантановая камедь 50,0 мг, вода очищенная до 10 мл.

- «Детралекс®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 1000 мг и «Венарус®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 900 мг: целлюлоза микрокристаллическая 124 мг, карбоксиметилкрахмал натрия 54 мг, желатин 62 мг, тальк 12 мг, магния стеарат 8 мг;
- «Флебавен®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой: 1000 мг: карбоксиметилкрахмал натрия 27 мг, тальк 6 мг, магния стеарат 4 мг;
- «Флебодиа®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 600 мг: тальк 10,24 мг, кремния диоксид коллоидный 3,5 мг, стеариновая кислота 50,05 мг, целлюлоза микрокристаллическая до 910 мг;
- «Флебифа®» таблетки 600 мг: целлюлоза микрокристаллическая до 1000 мг, карбоксиметилкрахмал натрия 40 мг, желатин 50 мг, тальк 12 мг, магния стеарат 10 мг;
- «Детравенол®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 1000 мг: целлюлоза микрокристаллическая до 1300 мг, карбоксиметилкрахмал натрия 54 мг, желатин 27 мг, магния стеарат 13 мг.

В методе газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС) - площади пика ионной хроматограммы для характеристического иона 303), полученных из двух различных серий образцов крови после жидкость-жидкостной экстракции верапамила. Серию образцов № 1 составили экстракты из холостых проб крови, в которые перед экстракцией добавлен верапамил в концентрациях 500,0 нг/мл, 2000,0 нг/мл и 5000,0 нг/мл. Серию образцов №2 составили аналогичные экстракты из холостых проб крови, в которые верапамил был добавлен после процедуры экстракции [15].

Расчет СИ проводили по формуле:

$$СИ = \frac{A_1}{A_2} \times 100\%$$

где: A_1 – интенсивность аналитического сигнала для диосмина / верапамила в пробах серии № 1, усл.е.

A_2 – интенсивность аналитического сигнала для диосмина / верапамила в пробах № 2, усл.е.

2.9. Математическое планирование пробоподготовки методами твердо-жидкостной и жикость-жидкостной экстракции.

Формирование матрицы эксперимента по схеме многофакторного трехуровневого планирования экспериментов с применением плана Бокса-Бенкена с учетом уровня влияния исследуемых факторов осуществляли с помощью программы ChemPlan 1.0 [100]. Для статистической обработки экспортированного массива экспериментальных данных из программы «ChemPlan 1.0» применяли программу «Statistica 10.0» [118]

2.10. Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую обработку результатов анализа осуществляли методами вариационной статистики, корреляционного, однофакторного дисперсионного анализа с применением компьютерных программ «ChemMetr 1.0» [102], «ChemMetr Evaluation 1.0» [101], а также «Statistica 10.0» (Statsoft Inc., USA) [118].

Методы вариационной статистики предполагали расчет средних значений величин \bar{x} , стандартного отклонения S , дисперсии S^2 , расчет t -критерия Стьюдента, исследования полуширины доверительного интервала Δx [3].

Определение объема аналитической серии (необходимого числа параллельных определений) осуществляли по формуле:

$$m = \left(\frac{\Delta x \cdot 100}{\bar{\varepsilon} \cdot \bar{x}} \right)^2,$$

где m – объем аналитической серии; Δx – полуширина доверительного интервала; $\bar{\varepsilon}$ – относительная ошибка среднего значения, %; \bar{x} – среднее значение определяемого содержания анализируемого вещества [44].

Корреляционный анализ применяли для исследования взаимосвязи между ошибками: систематической и относительной ошибкой среднего значения, а также между показателями эффективности экстракции диосмина и верапамила и набором факторных показателей [45].

Однофакторный дисперсионный анализ использовался для проверки гипотез о равенстве относительной ошибки среднего значения и систематической ошибки, определении статистически значимых различий между данными величинами [113].

Величину уровня значимости p (приемлемую границу статистической значимости) для критериев Стьюдента и F -критерия устанавливали равной 0,05.

Определение диапазона определяемых концентраций, правильности и прецизионности проводили в соответствии с рекомендациями [15].

ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ (НА ПРИМЕРАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИОСМИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И ВЕРАПАМИЛА В КРОВИ)

Для определения метрологических характеристик методик необходимо использовать стандартные образцы с известными и документально подтвержденными параметрами. Необходимая степень их чистоты зависит от задач, которые решаются при их использовании.

В настоящей диссертационной работе образцы серийной продукции – лекарственные препараты на основе фармацевтической субстанции диосмина и модельные образцы крови с известной концентрацией верапамила использовались в качестве образцов сравнения (рабочих стандартных образцов).

Функция образцов сравнения в метрологическом исследовании заключалась в том, что они являются средствами передачи измеряемой величины – содержания диосмина и верапамила в исследуемых объектах.

Таким образом, содержание диосмина и концентрация верапамила в вышеуказанных образцах сравнения – это «принятые опорные значения», которые использованы для интервальной оценки погрешности, правильности и прецизионности (воспроизводимости). Ключевым моментом является то, что лекарственные препараты с диосмином и модельные образцы крови являются не

объектами исследования как таковыми, а инструментами метрологического эксперимента по оценке методик количественного анализа в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе.

Важным этапом разработки методики количественного определения в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе является определение ее метрологических характеристик, которое проводится в рамках валидации или аттестации соответствующей аналитической методики.

Целесообразно планировать эксперимент таким образом, чтобы соответствующие метрологические характеристики изучались одновременно, обеспечивая полное понимание возможностей аналитической методики: линейность, диапазон применения, правильность и прецизионность.

Процедура определения метрологических характеристик в контроле качества лекарственных средств регламентируется общей фармакопейной статьей ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента», а также возможно использовать научно-практические руководства для фармацевтической отрасли «Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов» и «Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств» [15,44,97].

В судебно-химической экспертизе при исследовании объектов биологического происхождения целесообразно применять «Руководство по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала».

При оценке метрологических характеристик методик количественного определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в образцах крови осуществляли определение линейности/рабочего диапазона концентраций, правильности, прецизионности (на уровне сходимости).

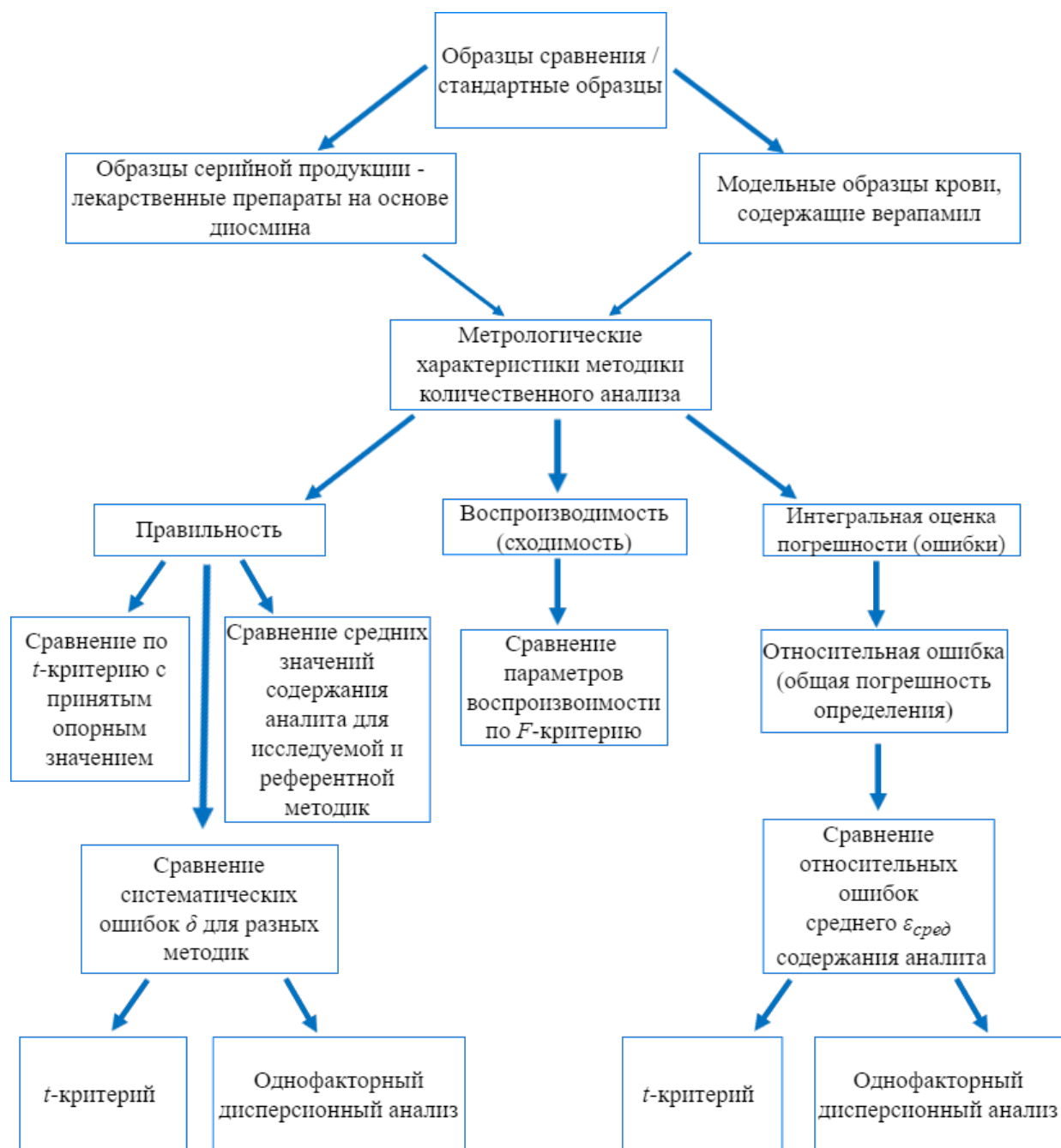


Рисунок 2 – Алгоритм исследования метрологических характеристик методик количественного определения.

Алгоритм исследования метрологических характеристик методик количественного определения представлен на схеме (рис.2).

3.1. Определение метрологических характеристик методики количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии

Для контроля качества лекарственных препаратов на основе фармацевтической субстанции диосмина соответствующие фармакопейные статьи предлагают количественное определение основного действующего вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве альтернативного варианта количественного анализа диосмина предложен метод спектрофотометрии.

В спектре поглощения диосмина в УФ-диапазоне присутствуют два выраженных максимума при длинах волн 268 нм и 370 нм, которые были выбраны в качестве аналитических длин волн (рис. 3).

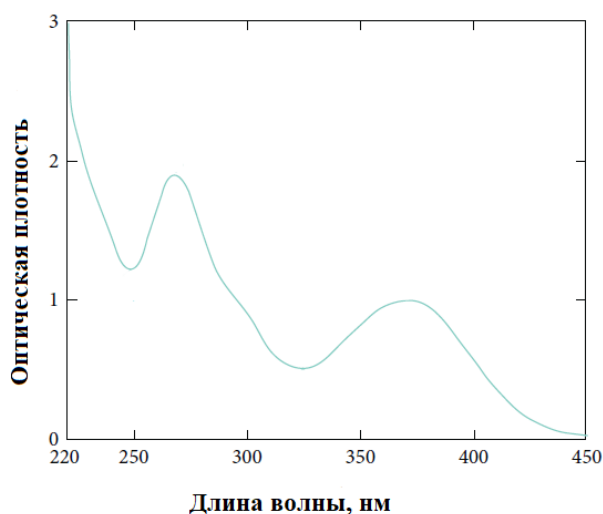


Рисунок 3 – Спектр поглощения диосмина (0,001% в растворе натрия гидроксида концентрации 0,02 моль/л).

Разработку методики спектрофотометрии проводили путем адаптации существующей методики из литературного источника [145].

Основным изменением, вносимым в указанную методику, является замена способа расчета содержания диосмина: вместо построения градуировочной

зависимости предполагается использование удельных показателей поглощения при длинах волн 268 нм и 370 нм. Отказ от варианта градуировочного графика обусловлен невозможностью постоянного применения в рутинной аналитической практике стандартного образца диосмина («Hyderabad», Индия). При количественном определении методом УФ-спектрофотометрии нормативными документами не рекомендуется использовать удельный показатель поглощения, однако при необходимости его применения следует устанавливать его значение по результатам межлабораторного эксперимента.

Таким образом, изменение, вносимое в указанную методику, предполагает определение следующих параметров:

- диапазонов линейности и значений удельных показателей поглощения (на основании межлабораторного исследования) диосмина при длинах волн 268 нм и 370 нм;

- относительной ошибки (погрешности) удельных показателей поглощения диосмина при длинах волн 268 нм и 370 нм;

- метрологических характеристик методик количественного определения диосмина в лекарственных препаратах: «Детралекс® 1000 мг» суспензия и таблетки, «Венарус® 900 мг» таблетки, «Флебофа® 600 мг» таблетки, «Флебодиа® 600 мг» таблетки, «Детравенол® 1000 мг» таблетки, «Флебавен® 1000 мг» таблетки;

- сравнительной метрологической оценки методик количественного определения диосмина в вышеуказанных лекарственных препаратах при длинах волн 268 нм и 370 нм.

Определение линейности осуществляли путем построения градуировочных зависимостей (концентрация-оптическая плотность) на сериях рабочих стандартных растворов образца диосмина (не менее 5 концентраций), приготовленных растворением его точной навески в растворе натрия гидроксида концентрации 0,02 моль/л (табл. 1).

Таблица 1 – Первичные аналитические данные градуировочной зависимости для количественного определения диосмина методом УФ-спектрофотометрии

	Длина волны 268 нм		Длина волны 370 нм	
	Концентрация C , %	Оптическая плотность D	Концентрация C , %	Оптическая плотность D
1.	0,0002	0,11	0,0003	0,097
2.	0,0004	0,22	0,0008	0,24
3.	0,0008	0,55	0,001	0,388
4.	0,001	0,88	0,002	0,5
5.	0,002	0,98	0,003	0,93

По полученным аналитическим данным строили градуировочные графики (зависимости оптической плотности от концентрации диосмина в фотометрируемом растворе), по графикам визуально оценивали линейность (рис. 4).

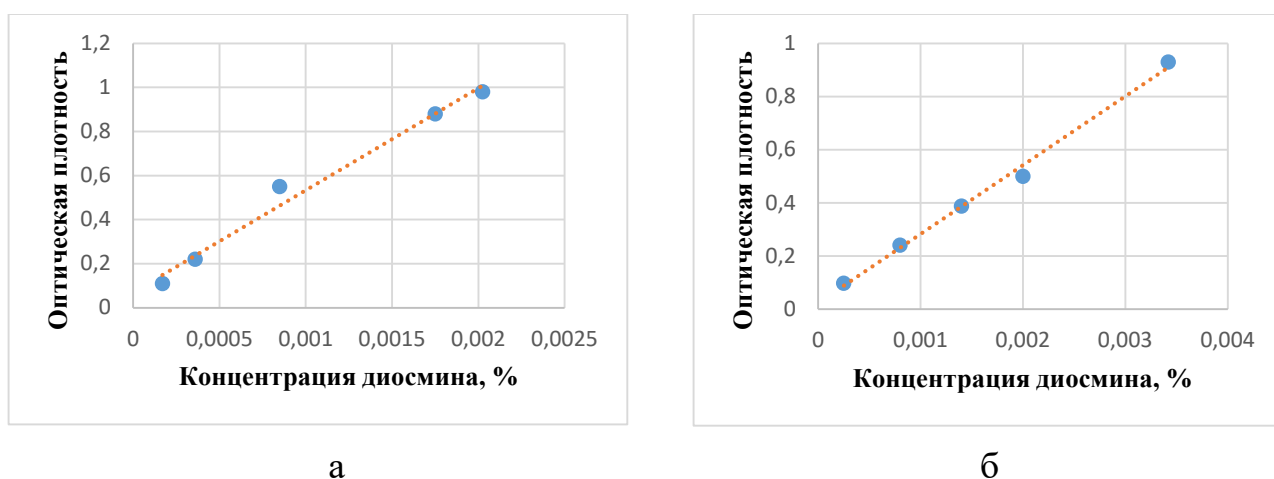


Рисунок 4 – Графики градуировочной зависимости диосмина при длинах волн 268 нм (а) и 370 нм (б).

Результаты регрессионного анализа данных градуировочной зависимости для количественного определения диосмина методом УФ-спектрофотометрии в соответствие с требованиями ГФ XIV издания представлены в таблице 2. Линейный регрессионный анализ был выполнен методом наименьших квадратов, что является стандартным методическим подходом для фармацевтического анализа.

Таблица 2 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных количественного определения диосмина методом УФ-спектрофотометрии

f	$C_{\text{сред}}, \%$	$D_{\text{сред}}$	a	b	$t(P, f)$	Δa	Δb	S_0^2	r
длина волны 268 нм									
3	0,0010	0,55	463,47	0,070	3,18	24,61	0,0033	0,077	0,991
для $a - t_{\text{эксн}}=13,25, p = 0,0009$; для $b - t_{\text{эксн}}=1,58, p = 0,21$.									
длина волны 370 нм									
3	0,0016	0,43	259,24	0,023	3,18	9,93	0,0087	0,031	0,997
для $a - t_{\text{эксн}}=22,79, p = 0,0002$; для $b - t_{\text{эксн}}=1,05, p = 0,37$.									

В результате определены параметры градуировочной зависимости: коэффициенты чувствительности a , которые для определений при длинах волн 268 нм и 370 нм составили 463,0 и 259,0 соответственно; свободные члены уравнения линейной регрессии $b - 0,070$ и $0,023$. Коэффициент корреляции r составил 0,991 для определения при длине волны 268 нм и 0,997 – при длине волны 370 нм.

Кроме того, при определении линейности осуществлялась проверка статистической значимости коэффициентов уравнения линейной регрессии. Значение уровня значимости p более 0,05 свидетельствует о том, что данный коэффициент статистически значимо не отличается от нуля и его нецелесообразно использовать в уравнении градуировочной зависимости. Таким образом, в полученных уравнениях линейной градуировочной зависимости коэффициенты b статистически незначимы.

Однако при фармакопейном алгоритме регрессионного анализа оценка линейности осуществляется только по величине коэффициента корреляции r , которая должна составлять не менее 0,98.

Для оценки ошибки градуировки выполнен анализ остатков (отклонений экспериментальных значений оптической плотности от значений оптической плотности рассчитанных по уравнению линейной регрессии), графики распределения остатков приведены на рисунке 5. Для аналитической длины волны 268 нм наибольшая величина отклонения отмечена для концентрации диосмина 0,0009%, для остальных концентраций значимых отклонений не наблюдали. При

аналитической длине волны 370 нм для всего диапазона концентраций диосмина распределение остатков было равномерным.

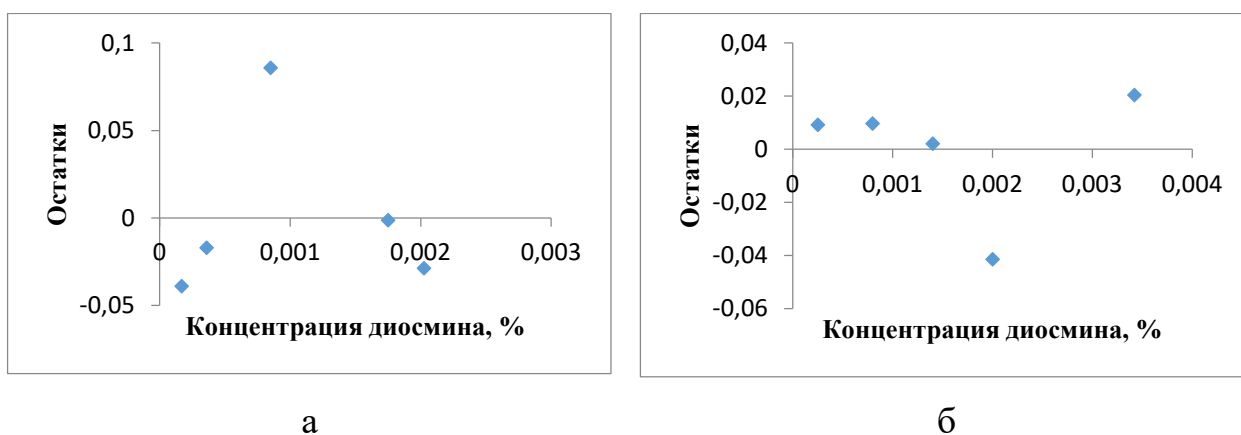


Рисунок 5 – Графики распределения остатков (отклонений экспериментальных и расчетных значений оптической плотности) для градуировочной зависимости диосмина при длинах волн 268 нм (а) и 370 нм (б).

Таким образом, линейные диапазоны методики спектрофотометрического определения диосмина составили 0,0002-0,002% – для аналитической длины волны 268 нм и 0,0003-0,003% – для 370 нм.

Коэффициент чувствительности a уравнения линейной зависимости при условии пересчета на концентрацию фотометрируемого раствора 1% и толщину поглощающего слоя раствора (толщину кюветы) 1 см является удельным показателем поглощения $E^{1\%}_{1\text{см}}$. Таким образом, из полученных уравнений линейной градуировочной зависимости были определены значения удельных показателей поглощения для диосмина в растворе натрия гидроксида концентрации 0,02 моль/л при длинах волн 268 нм и 370 нм, они составили $463,0 \pm 24,6$ и $259,0 \pm 9,9$ соответственно.

Относительные ошибки (погрешности) вышеуказанных удельных показателей поглощения диосмина, определенные в условиях межлабораторного эксперимента и влияющие на общую погрешность результатов определения, составили 5,3% и 3,8% (табл. 3).

Таблица 3 – Относительные ошибки значений удельных показателей поглощения диосмина в методе УФ-спектрофотометрии (межлабораторный эксперимент)

Номер лаборатории	Относительная ошибка серии измерений					$\Delta_{\text{сред}}, \%$	S
	$\Delta_1, \%$	$\Delta_2, \%$	$\Delta_3, \%$	$\Delta_4, \%$	$\Delta_5, \%$		
длина волны 268 нм							
1	6,61	2,85	6,39	4,90	5,20	5,20	1,50
2	5,64	4,50	4,21	5,00	7,65	5,40	1,37
						5,3	
длина волны 370 нм							
1	3,32	2,58	6,95	2,85	4,79	4,10	1,81
2	3,61	4,74	4,76	2,16	2,23	3,50	1,28
						3,8	

Полученные значения удельных показателей поглощения диосмина были использованы для количественного определения диосмина в лекарственных препаратах на его основе. Одним из ключевых моментов при реализации процедуры их пробоподготовки является получение экстрактов с концентрацией диосмина, которая соответствует линейному диапазону применяемой спектрофотометрической методики. Для варианта определения при длине волны 268 нм данный диапазон концентраций составляет 0,0002-0,002%, при длине волны 370 нм – 0,0003-0,003%. При недоступности стандартного образца в качестве принятых опорных значений использовали заявленные производителями лекарственных препаратов содержания диосмина.

Метрологические характеристики методики количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом спектрофотометрии при аналитических длинах волн 268 и 370 нм представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Метрологические характеристики методики количественного определения диосмина методом УФ-спектрофотометрии в лекарственных препаратах

μ , мг	f	$x_{\text{сред}}$, мг	S^2	S	P	$t(P, f)$	Δx	ε , %	$\varepsilon_{\text{сред}}$, %	$t_{\text{эксп}}$	$F(P, f_1, f_2)$	$F_{\text{выч}}$	δ , %
«Детралекс®» сусп/268 нм /370 нм													
900,00	9	916,14	21365,51	146,17	0,95	2,26	330,34	36,06	11,40	0,35	5,35	1,89	1,79
900,00	9	906,90	11306,40	106,33	0,95	2,26	240,31	26,50	8,38	0,21			0,77
«Венарус®» /268 нм /370 нм													
900,00	9	917,67	14936,42	122,21	0,95	2,26	276,21	30,10	9,52	0,46	5,35	1,38	1,96
900,00	9	890,08	10793,48	103,89	0,95	2,26	234,80	26,38	8,34	0,30			1,10
«Детралекс®» табл/268 нм /370 нм													
900,00	9	854,62	11873,63	108,97	0,95	2,26	246,26	28,82	9,11	1,32	5,35	0,90	5,04
900,00	9	918,81	10693,63	103,41	0,95	2,26	233,71	25,44	8,04	0,58			2,09
«Флебофа®» /268 нм /370 нм													
600,00	9	630,91	12146,91	110,21	0,95	2,26	249,08	39,4796	12,48	0,89	5,35	2,39	5,15
600,00	9	610,55	5089,68	71,34	0,95	2,26	161,23	26,41	8,35	0,47			1,76
«Детравенол®» табл, /268 нм /370 нм													
1000,00	9	940,40	12709,78	112,74	0,95	2,26	254,79	27,09	8,57	1,67	5,35	1,87	5,96
1000,00	9	967,25	6792,40	82,42	0,95	2,26	186,26	19,26	6,09	1,26			3,28
«Флебавен®» табл, /268 нм /370 нм													
1000,00	9	1052,53	15714,63	125,36	0,95	2,26	283,31	26,92	8,51	1,33	5,35	2,49	5,25
1000,00	9	979,37	6306,42	79,41	0,95	2,26	179,47	18,33	5,80	0,82			2,06
«Флебодиа®» табл, /268 нм /370 нм													
600,00	9	566,38	9160,40	95,71	0,95	2,26	216,30	38,19	12,08	1,11	5,35	2,13	5,60
600,00	9	619,17	4301,26	65,58	0,95	2,26	148,22	23,94	7,57	0,92			3,20

Условные обозначения: μ – истинное значение содержания диосмина в лекарственном препарате (принятое опорное значение), г; $x_{\text{сред}}$ – среднее значение содержания диосмина в лекарственном препарате, определенное экспериментальным путем, г; f – число степеней свободы; S^2 – дисперсия; S – стандартное отклонение; P – уровень доверительной вероятности; Δx – полуширина доверительного интервала среднего значения; ε – относительная ошибка (погрешность) единичного определения, %; $\varepsilon_{\text{сред}}$ – относительная ошибка (погрешность) среднего значения, %; δ – относительное отклонение среднего значения содержания диосмина в лекарственном препарате от истинного значения содержания (систематическая ошибка), %.

На примере метрологических характеристик методики анализа лекарственного препарата «Детралекс®» суспензия (аналитическая длина волны 268 нм) приведено определение объема аналитической серии:

$$m = \left(\frac{330,34 \cdot 100}{11,40 \cdot 916,14} \right)^2 = 10.$$

Величина относительной ошибки при определении среднего значения содержания диосмина в лекарственных препаратах находилась в диапазонах: 8-12% – для аналитической длины волны 268 нм и 6-8% – для 370 нм.

Сравнение параметров воспроизводимости (прецизионности) методик спектрофотометрического количественного определения диосмина в лекарственных препаратах при аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм показало, что для всех препаратов, статистически значимое различие

воспроизводимости отсутствует: значения F -критерия находились в диапазоне 0,9-2,49 и не превышали его табличного значения $F(99\%; 9; 9)=5,35$.

Одним из фармакопейных требований по статистической обработке результатов количественного анализа является оценка наличия/отсутствия систематической ошибки на основании сравнения значения экспериментального t -критерия с табличным. Полученные экспериментальные значения t -критерия для результатов анализа диосмина во всех рассмотренных лекарственных препаратах находились в диапазонах 0,35-1,67 и 0,21-1,26 для длин волн 268 нм и 370 нм соответственно, что не превышало табличного значения t -критерия. Следует отметить, что в ОФС.1.1.0013.15 не приводится содержательная расшифровка понятия «отягощенность систематической ошибкой».

Из приведенных экспериментальных данных следует, что полученные результаты анализа не отягощены систематической ошибкой, но при этом рассчитанные отклонения данных результатов от принятых опорных значений составляют 1,79-5,96% – для аналитической длины волны 268 нм и 0,77-3,28% – для 380 нм. Указанные отклонения являются систематическими ошибками.

Отсутствие систематической ошибки по фармакопейной интерпретации не исключает возможности ее количественной оценки и последующего статистического анализа.

3.2 Определение метрологических характеристик методик количественного определения верапамила в крови, применяемых в судебно-химической экспертизе

Биологический материал (биологические жидкости, органы) относится к многокомпонентным объектам аналитического контроля, для которых одним из основных факторов, лимитирующих относительную ошибку анализа в целом, является пробоподготовка, она должна быть воспроизводимой и обеспечивать максимальную степень извлечения анализируемого вещества. Также следует отметить, что фармацевтический анализ в отличие от судебно-химической экспертизы носит подтверждающий характер: в контроле качества лекарственных

средств аналитик имеет априорную информацию о количестве анализируемого вещества в исследуемом объекте, а химик-эксперт в большинстве случаев не обладает достоверной информацией о структуре и концентрации аналита.

Перечень основных метрологических характеристик для методик количественного определения, применяемых в судебно-химической экспертизе, включает пределы обнаружения и количественного определения, правильность, прецизионность, рабочий диапазон концентраций анализируемого вещества.

В пределах рабочего диапазона концентраций анализируемого вещества в зависимости от применяемого аналитического метода могут реализованы линейные, а также полиномиальные градуировочные модели.

Методический подход к определению метрологических характеристик методик количественного анализа не предусматривает определение интегральных параметров погрешности – относительной ошибки единичного определения и относительной ошибки среднего значения.

Метрологические характеристики: рабочий диапазон концентраций, правильность, прецизионность (сходимость) были определены для следующих методик количественного определения верапамила в крови:

- УФ-спектрофотометрия при длине волны 277 нм, абсолютная градуировка [6];
- газовая хроматография с масс-селективным детектированием, градуировка методом внутреннего стандарта (дифениламин) [71];
- ТСХ с компьютерной денситометрией, абсолютная градуировка [7].

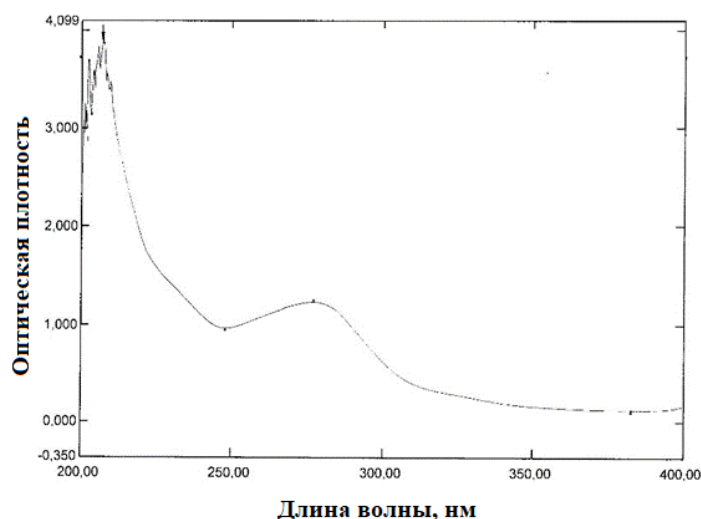


Рисунок 6 – Спектр поглощения экстракта из образца крови (концентрация верапамила 10,0 мкг/мл).

В основе пробоподготовки образцов крови для всех вышеуказанных методик лежит жидкость-жидкостная экстракция хлороформом при значении водной фазы pH 9-11.

При спектрофотометрическом определении выраженные максимумы в спектре поглощения регистрировали для экстракта с концентрацией верапамила 10,0 мкг/мл, в качестве аналитической использовали длину волны 277 нм (рис. 6).

В практике рутинного судебно-химического анализа для методик количественного определения методом спектрофотометрии реализуется следующий алгоритм:

- определение диапазона линейности и построение линейной градуировочной зависимости на рабочих растворах стандартного образца анализируемого вещества;

- перенос методики на образцы биологического материала (включение в процедуру анализа стадии пробоподготовки);

- экспериментальное определение рабочего диапазона концентраций: подбор параметров пробоподготовки, направленный на то, чтобы концентрация анализируемого вещества в экстракте находилась в диапазоне линейности;

- периодический оперативный контроль и корректировка параметров линейной градуировочной зависимости,

Определение линейности осуществляли путем построения градуировочных зависимостей (концентрация C - оптическая плотность D) на сериях рабочих стандартных растворов образца верапамила в диапазоне концентраций 1,0-200,0 мкг/мл (табл. 5).

Таблица 5 – Первичные аналитические данные градуировочной зависимости для количественного определения верапамила в крови методом УФ-спектрофотометрии

	Концентрация C , мкг/мл	Оптическая плотность D
1	8,0	0,11
2	20,0	0,23
3	50,0	0,51
4	80,0	0,80
5	100,0	1,01

По полученным аналитическим данным строили градуировочный график (зависимости оптической плотности от концентрации верапамила в фотометрируемом растворе), визуальная оценка его линейности свидетельствовала о соблюдении закона Бугера-Ламберта-Бера в диапазоне концентраций 8,0-100,0 мкг/мл (рис. 7).

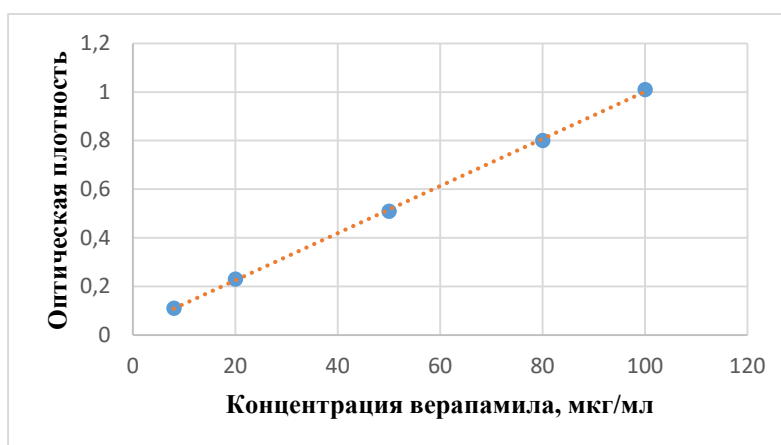


Рисунок 7 – График градуировочной зависимости верапамила при длине волны 277 нм.

Результаты регрессионного анализа данных градуировочной зависимости для количественного определения верапамила методом УФ-спектрофотометрии представлены в таблице 6. Коэффициент чувствительности a имел небольшое значение и составил 0,0090, свободный член уравнения линейной регрессии b – 0,072. Коэффициент корреляции r равен 0,998.

Таблица 6 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных количественного определения верапамила методом УФ-спектрофотометрии

f	$C_{\text{сред}},$ мкг/мл	$D_{\text{сред}}$	a	b	$t(P, f)$	Δa	Δb	S_0^2	r
3	51,6	0,53	0,0090	0,072	3,18	0,0033	0,020	0,0010	0,998
для $a - t_{\text{экс}}=94,44, p < 0,05;$ для $b - t_{\text{экс}}=4,88, p = 0,02.$									

Проверка значимости коэффициентов уравнения линейной регрессии показала, что они статистически достоверно отличаются от нуля – значения уровня значимости p было менее 0,05.

Перенос методики на модельные образцы крови с концентрацией верапамила 5,0-500,0 мкг/мл, связанный с включением в процедуру анализа этапа пробоподготовки, показал, что рабочий диапазон концентраций спектрофотометрической методики количественного определения верапамила сдвинулся в область более высоких концентраций и составил 10,0-150,0 мкг/мл.

Для оценки правильности и прецизионности (сходимости) методики анализировали образцы крови с известными количествами верапамила трех уровней концентраций в пределах рабочих диапазона. Определяли сходимость результатов измерений (относительное стандартное отклонение), полученных в 6 разных аналитических циклах – между сериями параллельных определений в разные дни (табл. 7).

Таблица 7 – Правильность и прецизионность количественного определения верапамила в крови методом УФ-спектрофотометрии

Уровни концентраций в образцах крови, мкг/мл	Правильность, %	Сходимость между сериями параллельных определений, %
Нижний 20,0	12,4	5,4
Средний 50,0	22,7	5,8
Высокий 100,0	27,5	7,4

Относительные погрешности определения верапамила в крови методом УФ-спектрофотометрии, используемые для оценки правильности методики, для всех уровней концентраций не превышали значения $\pm 27,5\%$. Сходимость результатов определений верапамила на всех уровнях концентраций не превышала $7,4\%$.

Таблица 8 – Метрологические характеристики методики количественного определения верапамила в крови методом УФ-спектрофотометрии

μ , мкг/мл	f	$x_{ср}$, мкг/мл	S^2	S	P	$t(P, f)$	Δx	$\varepsilon, \%$	$\varepsilon_{ср}, \%$	$\delta, \%$
20,0	5	22,48	8,76	2,96	0,95	2,57	7,61	33,84	13,82	12,40
50,0	5	61,35	306,25	17,50	0,95	2,57	44,98	73,31	29,93	22,70
100,0	5	127,50	1690,03	41,11	0,95	2,57	105,65	82,86	33,83	27,50

На примере метрологических характеристик методики анализа модельных проб крови (содержание верапамила 20,0 мкг/мл) представлено определение объема аналитической серии:

$$m = \left(\frac{7,61 \cdot 100}{13,89 \cdot 22,48} \right)^2 = 6.$$

Для унификации представления метрологических характеристик для методик количественного определения в фармацевтическом анализе и судебно-химической экспертизе был выполнен пересчет данных правильности и прецизионности спектрофотометрического количественного определения верапамила в крови по алгоритму оценки метрологических характеристик, представленному в ГФ XIV издания (табл. 8).

Следующим этапом осуществляли сравнительное определение метрологических характеристик хроматографических методов анализ верапамила в пробах крови: ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией.

В хроматографических методиках в отличие от спектрофотометрии, где целесообразно использовать значения оптической плотности в интервале 0,1-1,0, отсутствует жесткое ограничение по диапазону значений аналитического сигнала (измеряемой величины). Поиск рабочего диапазона концентраций верапамила

проводили экспериментальным путем, исходя из основной прикладной задачи судебно-химической экспертизы: определения токсических, летальных концентраций верапамила в образцах крови.

Для хромато-масс-спектрометрической методики рабочий диапазон концентраций верапамила, определенный на модельных образцах крови, составил 50,0-5000,0 нг/мл.

Градуировочная зависимость характеризуется уравнением:

$$Q_{вер}/Q_{BC} = 1,40 \cdot (C_{вер}/C_{BC}) - 0,052,$$

где $Q_{вер}/Q_{BC}$ – отношение площадей пиков целевых ионов верапамила и внутреннего стандарта дифениламина; $C_{вер}/C_{BC}$ – отношение концентраций верапамила (нг/мл) и внутреннего стандарта (нг/мл) для образцов крови. Коэффициент корреляции r равен 0,997.

При определении верапамила методом ТСХ с компьютерной денситометрией была определена градуировочная зависимость, которая описывается уравнением полиномиальной (квадратичной) регрессии:

$$S = 0,081 \cdot C^2 + 36,21 \cdot C - 501,30,$$

где S – площадь хроматографической зоны верапамила, у.е.; C – концентрация верапамила в образце крови, нг/мл.

Диапазон концентраций верапамила в крови, в которых возможно проводить количественное определение (рабочий диапазон методики) – 300,0-5000,0 нг/мл. Значение коэффициента корреляции составляет 0,892.

Для построения графика полиномиальной (квадратичной) градуировочной зависимости необходимо использовать не менее четырех проб стандартных образцов с концентрациями верапамила, находящимися в рабочем диапазоне методики.

Упрощенная методика количественного определения верапамила в крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией предполагает применение линейной регрессии в вышеуказанном диапазоне концентраций верапамила и использование двух градуировочных стандартных образцов.

Уравнение линейной градуировочной зависимости имеет вид:

$$S = 96,20 \cdot C - 489,74.$$

Коэффициент корреляции r равен 0,786.

Параметры правильности и прецизионности (сходимости) количественного определения верапамила в крови рутинным методом ГХ-МС и альтернативным методом ТСХ с компьютерной денситометрией представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Правильность и прецизионность количественного определения верапамила в крови методами газовой хроматографии с масс-селективным детектированием и ТСХ с компьютерной денситометрией

Метод анализа	Уровни концентраций в образцах крови, нг/мл	Правильность, %	Сходимость между сериями параллельных определений, %
ГХ-МС	Нижний 500,0	11,4	9,5
	Средний 2000,0	7,5	4,8
	Высокий 5000,0	6,3	4,4
ТСХ с компьютерной денситометрией	Нижний 500,0	26,8	30,5
	Средний 2000,0	19,2	12,6
	Высокий 5000,0	30,3	7,5

Относительные погрешности определения верапамила в крови методом ГХ-МС, используемые для оценки правильности методики, для всех уровней концентраций не превышали значения 11,4%. Для ТСХ с компьютерной денситометрией оценка правильности проводилась для аналогичных уровней концентраций и погрешность для нижнего и высокого уровня составила соответственно 26,8% и 30,3%.

Сходимость результатов определений верапамила методом ГХ-МС на всех уровнях концентраций не превышала 9,5%. При анализе верапамила методом ТСХ с компьютерной денситометрией разброс результатов увеличивался от 30,5% для нижнего уровня концентраций до 7,5% – для верхнего уровня.

Результаты пересчета данных правильности и прецизионности количественного определения верапамила в крови хроматографическими методами по алгоритму оценки метрологических характеристик ГФ XIV издания представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Метрологические характеристики методики количественного определения верапамила в крови хроматографическими методами

μ , нг/мл	f	$x_{ср}$, нг/мл	S^2	S	P	$t(P, f)$	Δx	$\varepsilon, \%$	$\varepsilon_{ср}$, %	$t_{эксп}$	$F(P, f_1, f_2)$	$F_{выч}$	$\delta, \%$
ГХ-МС/ ТСХ-КД													
500,0	5	557,0	16798,75	129,61	0,95	2,57	333,1	59,8	24,4	1,16	10,97	0,27	11,4
500,0	5	634,0	224351,74	473,66	0,95	2,57	1217,3	192,0	78,4	0,75			26,8
ГХ-МС/ ТСХ-КД													
2000,0	5	2150,0	63897,73	252,78	0,95	2,57	649,6	30,2	12,3	1,57	10,97	0,34	7,5
2000,0	5	2384,0	541372,21	735,78	0,95	2,57	1890,9	79,3	32,4	1,38			19,2
ГХ-МС/ ТСХ-КД													
5000,0	5	5315,0	328134,21	572,83	0,95	2,57	1472,2	27,7	11,3	1,45	10,97	0,24	6,3
5000,0	5	6515,0	5730086,94	2393,76	0,95	2,57	6151,9	94,4	38,5	1,67			30,3

Расчет необходимого числа параллельных определений представлен на примере модельных проб крови с содержанием верапамила 500 нг/мл:

$$m_{\text{ГХ-МС}} = \left(\frac{333,1 \cdot 100}{24,4 \cdot 557} \right)^2 = 6,$$

$$m_{\text{ТСХ-КД}} = \left(\frac{1217,3 \cdot 100}{78,4 \cdot 634} \right)^2 = 6.$$

Сравнение правильности и воспроизводимости методик количественного определения в крови проводили для методов ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией, так методики количественного определения имеют близкие рабочие диапазоны концентраций, которые отличаются только величиной предела количественного определения («нижней точкой градуировки») – 50,0 нг/мл и 300,0 нг/мл соответственно.

Сравнение воспроизводимости (прецизионности) вышеуказанных методик на трех уровнях концентраций верапамила в крови показало, что их воспроизводимость статистически значимо отличается и методика, основанная на ТСХ с компьютерной денситометрией, характеризуется большим разбросом результатов анализа, Это подтверждалось расчетом значений F -критериев, которые находились в диапазоне от 0,24 до 0,34, при этом его табличное значение равно $F(99\%; 5; 5)=10,97$.

Оценка результатов анализа по t -критерию (по «фармакопейному» алгоритму) показывает отсутствие систематической ошибки при количественном определении верапамила методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией: значения

экспериментальных t -критериев 1,16-1,57 и 0,75-1,67 для методов соответственно, что не превышает его табличного значения 2,23.

Выводы по главе 3

1. Для методики количественного определения диосмина методом УФ-спектрофотометрии линейные диапазоны составили 0,0002-0,002% – для аналитической длины волны 268 нм и 0,0003-0,003% – для 370 нм. Определены значения удельных показателей поглощения для диосмина в растворе натрия гидроксида концентрации 0,02 моль/л при длинах волн 268 нм и 370 нм, которые составили 463,0 и 259,0 соответственно. Относительные ошибки вышеуказанных удельных показателей поглощения диосмина имеют значения 5,3% и 3,8%.
2. С применением в качестве образцов сравнения лекарственных препаратов на основе фармацевтической субстанции диосмина определены метрологические характеристики методик его количественного определения методом УФ-спектрофотометрии с расчетом по удельным показателям поглощения при длинах волн 268 нм и 370 нм. Относительная ошибка определения среднего значения содержания диосмина не превышала 12,0%, правильность (систематическая ошибка) – не более 6%.
3. Методика количественного определения верапамила в крови методом УФ-спектрофотометрии характеризуется показателями правильности и прецизионности не превышающими значения 27,5% и 7,4% соответственно, при этом ее рабочий диапазон концентраций – 10,0-150,0 мкг/мл. Правильность и воспроизводимость количественного определения верапамила в крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием составляют соответственно 6,3-11,4% и 4,4-9,5% для диапазона концентраций 50,0-5000,0 нг/мл. Аналогичные показатели в интервале концентраций верапамила 300,0-5000,0 нг/мл для методики, основанной на тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией, равны 19,2-30,3% и 7,5-30,5%.
4. На примере методик количественного определения диосмина методом УФ-спектрофотометрии и верапамила в крови методами газовой хроматографии с масс-

селективным детектированием, тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией показано, что использование t -критерия для оценки «отягощенности» результатов анализа систематической ошибкой является недостаточным: в случаях когда t -критерий показывает отсутствие ошибки, наблюдается отклонение средних значений содержаний анализируемых веществ от принятых опорных значений.

ГЛАВА 4. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ (НА ПРИМЕРАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИОСМИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И ВЕРАПАМИЛА В КРОВИ)

Полученные метрологические характеристики методик количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии, а также определения верапамила в крови методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией были подвергнуты статистическому анализу, направленному на сравнение ошибок определения для разных аналитических методик, выявление закономерностей взаимосвязи общей ошибки определения с ее составляющими (систематической и случайной).

Статистический анализ осуществляли по следующему алгоритму:

- сравнение средних значений содержания (концентрации): диосмина в лекарственных препаратах, полученных методом УФ-спектрофотометрии при аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм; верапамила в пробах крови, полученных методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией (по уровням концентраций); в качестве референтной использовали методики или их модификации, имеющие меньшее значение систематической погрешности;

- сравнение относительных ошибок среднего значения содержания $\varepsilon_{\text{сред}}$: диосмина в лекарственных препаратах, полученных методом УФ-спектрофотометрии при аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм; концентрации верапамила в пробах крови, полученных методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией;

- сравнение систематических ошибок определения содержания δ : диосмина в лекарственных препаратах, полученных методом УФ-спектрофотометрии при аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм; концентрации верапамила в пробах крови, полученных методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией;

- однофакторный дисперсионный анализ относительных ошибок среднего значения содержания $\varepsilon_{\text{сред}}$ и систематических ошибок определения δ содержания для вышеуказанных вариантов количественного определения;

- корреляционный анализ «систематическая ошибка определения δ » - «относительная ошибка среднего значения содержания $\varepsilon_{\text{сред}}$ » для рассмотренных вариантов количественного определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в крови.

Сравнение средних значений содержания анализируемого вещества в одной серии образцов сравнения с применением разных аналитических методик в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе применяют для решения следующих метрологических задач:

- для оценки наличия/отсутствия систематической ошибки при сопоставлении с аналитической методикой, для которой доказана «неотягощенность» систематической ошибкой (референтной методикой);

- для выбора аналитической методики со статистически достоверным меньшим значением систематической ошибки.

Сравнение средних значений содержания анализируемого вещества дает предварительный прогноз различия ошибок определения, но не показывает вклада в нее систематической и случайной погрешностей.

Однофакторный дисперсионный анализ использовался для проверки гипотез о равенстве относительной ошибки среднего значения $\varepsilon_{\text{сред}}$ и систематической ошибки определения δ статистически значимых различий между данными величинами, по сути являясь расширенным методом сравнения средних.

Для определения связи между систематической ошибкой определения δ содержания анализируемого вещества и относительной ошибкой среднего значения содержания $\varepsilon_{\text{сред}}$, их характера, решения какая часть вариации результативного показателя связана с вариацией факторных показателей, а также для построения статистических моделей данных (математической, графической) применялся корреляционный анализ.

4.1. Статистический анализ метрологических характеристик методики количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии

Первым этапом оценки метрологических характеристик было сравнение средних значений результатов анализа диосмина в лекарственных препаратах, полученных при УФ-спектрофотометрии на аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм.

Таблица 11 – Результаты сравнения средних значений содержания диосмина в лекарственных препаратах (метод УФ-спектрофотометрии на аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм)

Препарат /длина волны	$x_{\text{сред}}$, мг	Для независимых выборок			Для зависимых выборок		
		$t(P, f)$	$t_{\text{экс}}$	p	$t(P, f)$	$t_{\text{экс}}$	p
«Детралекс®» сусп/268 нм	916,14	2,10	0,16	0,87	2,26	0,16	0,88
«Детралекс®» сусп/370 нм	906,90						
«Венарус®»/268 нм	917,67	2,10	0,54	0,59	2,26	0,54	0,61
«Венарус®»/370 нм	890,08						
«Детралекс®» табл/268 нм	854,62	2,10	1,35	0,19	2,26	1,44	0,18
«Детралекс®» табл/370 нм	918,81						
«Флебифа®»/268 нм	630,91	2,10	0,49	0,63	2,26	0,50	0,63
«Флебифа®»/370 нм	610,55						
«Детравенол®» табл, /268 нм	940,40	2,10	0,61	0,55	2,26	-0,69	0,51
«Детравенол®» табл, /370 нм	967,25						
«Флебавен®» табл, /268 нм	1052,53	2,10	1,56	0,14	2,26	1,61	0,14
«Флебавен®» табл, /370 нм	979,37						
«Флебодиа®» табл, /268 нм	566,38	2,10	1,44	0,17	2,26	2,19	0,06
«Флебодиа®» табл, /370 нм	619,17						

Сравнение проводилось по t -критерию в двух вариантах: для зависимых выборок и независимых выборок.

Из представленных данных видно, что t -критерий расчетный меньше его табличного значения при заданном уровне доверительной вероятности 95% для обоих вариантов спектрофотометрического анализа. Следовательно, средние значения содержания диосмина при количественном определении на аналитических длинах 268 нм и 370 нм статистически значимо не различаются. Использование двух алгоритмов сравнения (для зависимых и независимых выборок) обусловлено тем, что сравнение результатов анализа при различных длинах волн как независимых выборок является более строгим вариантом

статистического анализа и позволяет исключить случаи получения статистически недостоверных различий.

В качестве примера визуализации результатов сравнения средних значений содержания диосмина в лекарственном препарате «Детралекс®» суспензия на рисунке 8 приведены так называемые «ящичные» диаграммы. Для варианта независимых выборок центральной точкой диаграмм является среднее значение содержания диосмина в лекарственном препарате, края соответствуют величине стандартной ошибки среднего значения, границы «усов» диаграммы – доверительному интервалу. В случае зависимых выборок центральной точкой является медиана выборки результатов количественного определения, края диаграммы – первой и третьей квартилью выборки, «усы» – ее минимальным и максимальным значением. Диаграммы, полученные для лекарственного препарата «Детралекс®» суспензия, различаются размерами: диаграммы для УФ-спектрофотометрии при аналитической длине волны 370 нм визуально компактнее по сравнению с диаграммами для аналитической длины волны 268 нм. Это связано с различием параметров воспроизводимости (стандартного отклонения, дисперсии) для используемых вариантов спектрофотометрического анализа.

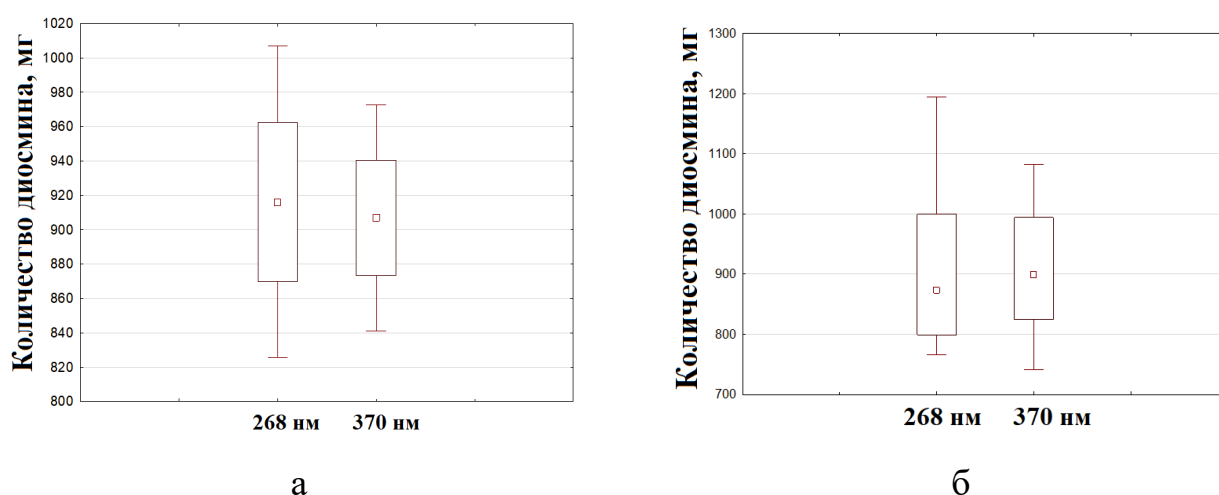


Рисунок 8 – Средние значения содержания диосмина в лекарственном препарате «Детралекс®» суспензия, полученные методом УФ-спектрофотометрии на аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм: для независимых (а) и зависимых выборок (б).

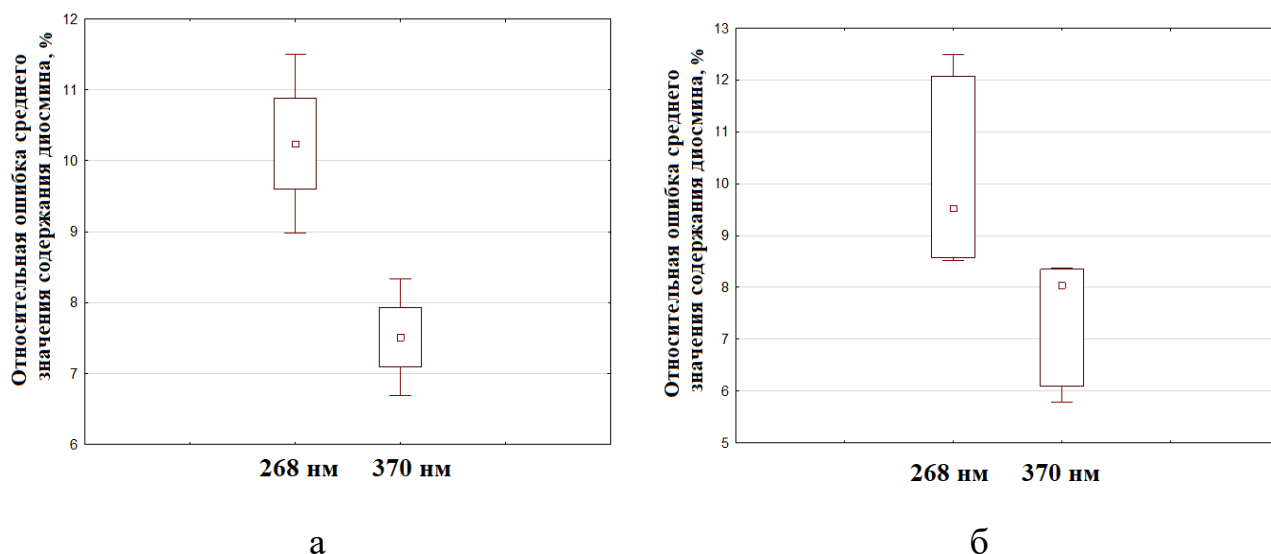


Рисунок 9 – Относительные ошибки средних значений содержания диосмина в лекарственных препаратах (метод УФ-спектрофотометрии на аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм): для независимых (а) и зависимых выборок (б).

При сравнении относительных ошибок среднего значения $\varepsilon_{\text{сред}}$ содержания диосмина в исследуемом ряду лекарственных препаратов при аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм с помощью t -критерия установлено, что в независимости от используемого варианта сравнения (независимая/зависимая выборка) имеются их статистически значимые различия. Расчетный t -критерий для независимых выборок имел значение 3,22 (при уровне значимости p менее 0,05), для зависимых – 4,79 (при уровне значимости p менее 0,05), что в обоих случаях превышало табличные значения t -критериев (табл. 12).

Таблица 12 – Результаты сравнения относительных ошибок средних значений содержания диосмина в лекарственных препаратах (метод УФ-спектрофотометрии на аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм)

Длина волны, нм	Относительная ошибка среднего значения $\varepsilon_{\text{сред}}$, %	$t(P, f)$	$t_{\text{экс}}$	p
Для независимых выборок				
268	9,86	2,23	3,22	0,0092
370	7,37			
Для зависимых выборок				
268	9,86	2,57	4,79	0,0049
370	7,37			

Аналогичную тенденцию наблюдали при сравнении систематических ошибок определения δ содержания диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии при аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм. Были установлены статистически значимые различия исследуемых характеристик, значения расчетных t -критериев равны 2,50 и 5,36 для независимых и зависимых выборок соответственно, в обоих случаях они превышают величины табличных t -критериев. Систематическая ошибка спектрофотометрического определения среднего содержания диосмина в лекарственных препаратах при аналитической длине волны 370 нм имеет более низкое значение: на 50% меньше соответствующей ошибки при аналитической длине 268 нм (табл. 13).

Таблица 13 – Результаты сравнения систематических ошибок определения содержания диосмина в лекарственных препаратах (метод УФ-спектрофотометрии на аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм)

Длина волны, нм	Систематическая ошибка определения δ , %	$t(P, f)$	$t_{\text{экс}}$	P
Для независимых выборок				
268	4,27	2,23	2,50	0,032
370	2,08			
Для зависимых выборок				
268	4,27	2,45	5,36	0,0030
370	2,08			

На рисунке 10 представлены «ящичные» диаграммы систематических ошибок определения содержания диосмина в лекарственных препаратах при УФ-спектрофотометрии на аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм для независимых и для зависимых выборок. В случае использования алгоритма сравнения для независимых выборок также не наблюдали перекрытия доверительных интервалов анализируемого параметра, что свидетельствует о невысоком уровне систематической ошибки количественного спектрофотометрического определения диосмина при длине волны 370 нм.

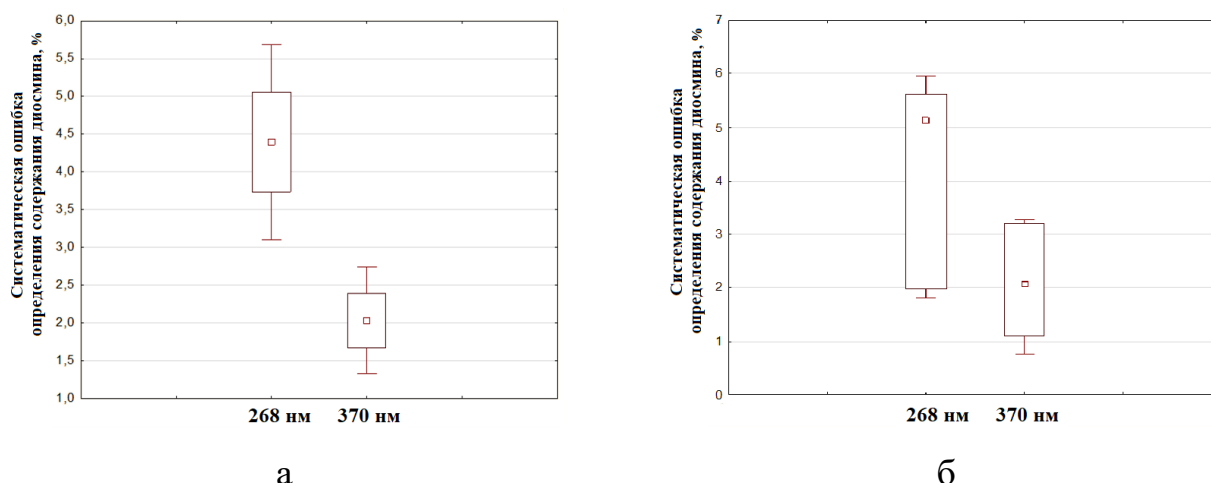


Рисунок 10 – Систематические ошибки определения содержания диосмина в лекарственных препаратах (метод УФ-спектрофотометрии на аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм): для независимых (а) и зависимых выборок (б).

В таблице 14 представлены результаты однофакторного дисперсионного анализа относительной ошибки среднего значения и систематической ошибки при определении содержания диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии. Они подтверждают наличие статистически значимых различий для параметров «относительная ошибка среднего значения содержания диосмина» и «систематическая ошибка определения» при количественном определении диосмина при различных длинах волн. Для обоих рассматриваемых параметров F -критерий (95%; 1; 12) расчетный имел значение, превышающее 4,75 – табличное значение F -критерия (95%; 1; 12). Уровни значимости F -критериев для относительной ошибки среднего значения содержания диосмина и систематической ошибки были менее 0,05.

Таблица 14 – Результаты дисперсионного анализа относительной ошибки среднего значения и систематической ошибки определения содержания диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии

Параметры	Общая дисперсия выборки $SS_{\text{общ}}$	Дисперсия эффекта $MS_{\text{эф}}$	Дисперсия межгрупповая SS	Дисперсия ошибки $MS_{\text{ошиб}}$	F -критерий	Уровень значимости p
$\epsilon_{\text{сред 268 нм}}$ / $\epsilon_{\text{сред 370 нм}}$	26,06	26,06	24,74	2,062	12,64	0,003
$\delta_{268 \text{ нм}}$ / $\delta_{370 \text{ нм}}$	19,49	9,74	23,76	1,98	9,84	0,008

Таким образом, на основании сравнительного статистического анализа получены следующие результаты:

- средние значения содержания диосмина в исследуемых лекарственных препаратах, определенные методом УФ-спектрофотометрии, не зависят от используемой аналитической длины волны;

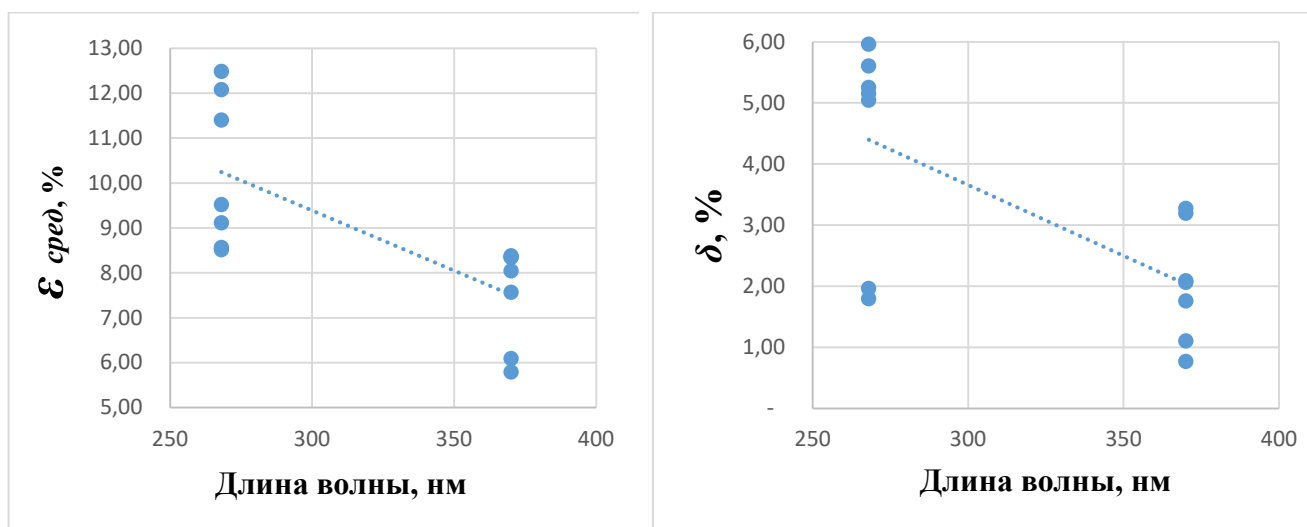
- относительные ошибки при определении среднего содержания диосмина методом УФ-спектрофотометрии при аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм статистически значимо различаются, относительная ошибка определения при аналитической длине волны 370 нм меньше на 25% соответствующей ошибки при аналитической длине волны 268 нм;

- систематические ошибки при определении содержания диосмина методом УФ-спектрофотометрии при аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм статистически значимо различаются, систематическая ошибка определения при аналитической длине волны 370 нм меньше на 50% соответствующей ошибки при аналитической длине волны 268 нм;

- сравнение средних значений содержания анализируемого вещества на примере УФ-спектрофотометрии диосмина в лекарственных препаратах при разных аналитических длинах волн, не является достаточным статистическим тестом проверки правильности методики, так как последующий статистический анализ показывает значимое различие систематических ошибок и погрешности определения в целом (относительной ошибки среднего значения содержания анализируемого вещества).

Анализ корреляционных зависимостей «относительная ошибка среднего значения – аналитическая длина волны» и «систематическая ошибка – аналитическая длина волны» показывает наличие связи между исследуемыми параметрами: величины коэффициентов корреляции r составляют -0,72 (для относительной ошибки среднего значения) и -0,67 (для систематической ошибки). В ходе количественного определения диосмина при переходе с аналитической длины волны 268 нм на длину волны 370 нм уменьшается ошибка анализа. Таким

образом, корреляционные зависимости подтверждают результаты выше проведенного сравнительного статистического анализа (рис. 11).



а

б

Рисунок 11 – Корреляционные зависимости «относительная ошибка среднего значения – аналитическая длина волны» (а) и «систематическая ошибка – аналитическая длина волны» (б) при УФ-спектрофотометрии диосмина в лекарственных препаратах.

Корреляционная зависимость между систематической ошибкой определения содержания диосмина и относительной ошибкой среднего содержания диосмина была определена как умеренная: значение коэффициента корреляции r составило 0,35 (рис. 12).

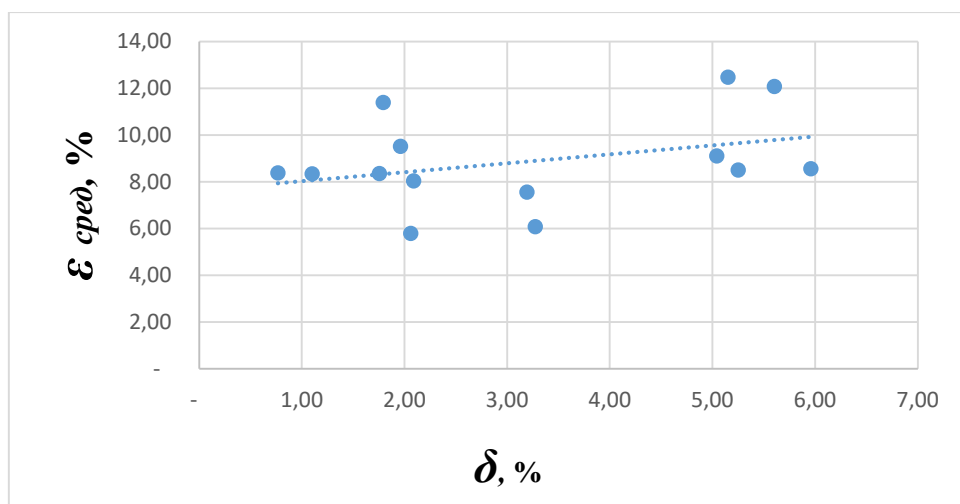


Рисунок 12 – Корреляционная зависимость «относительная ошибка среднего содержания» - «систематическая ошибка определения» при количественном определении диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии.

Таким образом увеличение систематической ошибки определения содержания диосмина в лекарственных препаратах приводит к нелинейному и незначительному увеличению относительной ошибки определения среднего содержания диосмина.

Следует предположить, что рост относительной ошибки среднего значения содержания диосмина в лекарственных препаратах связан с увеличением вклада случайных ошибок, в числе которых – ошибки на этапе пробоподготовки, связанные с извлечением анализируемого вещества из объекта исследования.

4.2. Статистический анализ метрологических характеристик методик количественного определения верапамила в крови, применяемых в судебно-химической экспертизе

Сравнение средних значений результатов анализа верапамила в пробах крови методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией для трех уровней концентраций также проводилось по t -критерию в двух вариантах: для зависимых выборок и независимых выборок.

Таблица 15 – Результаты сравнения средних значений концентрации верапамила в пробах крови, полученных методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией

Уровень концентрации верапамила в крови, нг/мл	Метод анализа	$x_{\text{сред}}$, нг/мл	Для независимых выборок			Для зависимых выборок		
			$t(P, f)$	$t_{\text{экс}}$	p	$t(P, f)$	$t_{\text{экс}}$	p
Нижний 500,0	ГХ-МС	557,0	2,23	0,38	0,71	2,57	0,33	0,75
	ТСХ-КД	634,0						
Средний 2000,0	ГХ-МС	2150,0	2,23	0,74	0,48	2,57	0,88	0,42
	ТСХ-КД	2384,0						
Высокий 5000,0	ГХ-МС	5315,0	2,23	2,22	0,051	2,57	1,82	0,13
	ТСХ-КД	6515,0						

Для рассматриваемых хроматографических методов анализа по всем уровням концентрации верапамила в крови расчетный t -критерий был меньше его табличного значения при заданном уровне доверительной вероятности 95%. Для уровня концентрации верапамила в крови 5000,0 нг/мл в варианте сравнения «независимые выборки» наблюдали минимальное различие t -критериев, соответствующее уровню значимости p 0,051 (табл. 15).

Из этого следует, что средние значения концентрации верапамила в пробах крови нижнем и среднем уровнях, полученные при количественном определении методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией, статистически значимо не различаются. Для высокого уровня концентраций верапамила наблюдается завышение результатов анализа в методе ТСХ с компьютерной денситометрией – до 23%.

При визуализации результатов сравнения средних значений для уровня концентраций верапамила 5000,0 нг/мл можно отметить, что «ящичные» диаграммы имеют различия в размере (рис. 13). Диаграммы для результатов анализа методом ГХ-МС компактнее диаграмм для ТСХ с компьютерной денситометрией, также различается длина «усов» диаграмм (доверительных интервалов) – меньшая величина наблюдается для метода ГХ-МС, что является свидетельством более высокой воспроизводимости результатов анализа в методе ГХ-МС. Графическое сравнение по алгоритму независимых выборок показывает незначительное перекрытие доверительных интервалов – это подтверждает

различие полученных концентраций верапамила в пробах крови в рассматриваемых хроматографических методах.

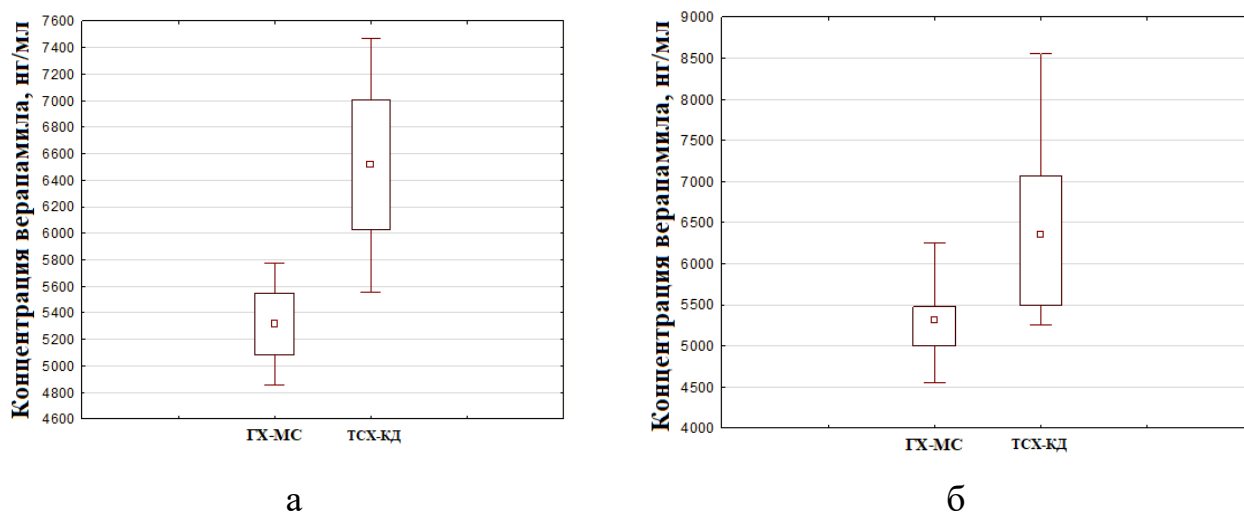


Рисунок 13 – Средние значения концентраций верапамила в крови при анализе методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией (уровень концентрации 5000,0 нг/мл): для независимых (а) и зависимых выборок (б).

Сравнение относительных ошибок средних значений $\varepsilon_{\text{сред}}$ концентрации верапамила в пробах крови (усредненных для трех уровней концентраций) при количественном определении методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией показало, что данные параметры статистически значимо различаются при варианте сравнения независимых выборок. Рассчитанный t -критерий для независимых выборок равен 2,83 (при уровне значимости p менее 0,05), для зависимых выборок – 3,27 (при уровне значимости p более 0,05), что в первом случае выше табличного значения t -критерия, а во втором – не превышало его (табл. 16).

Таблица 16 – Результаты сравнения относительных ошибок среднего значения концентраций верапамила в крови, полученных методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией

Метод анализа	Относительная ошибка среднего значения $\varepsilon_{\text{сред}}$, %	$t(P, f)$	$t_{\text{экс}}$	p
Для независимых выборок				
ГХ-МС	16,01	2,78	2,83	0,031
ТСХ-КД	49,77			
Для зависимых выборок				
ГХ-МС	16,01	4,30	3,27	0,082
ТСХ-КД	49,77			
- среднее значение для трех уровней концентраций верапамила в крови				

«Ящичные» диаграммы относительных ошибок средних значений концентрации верапамила в пробах крови (усредненных для трех уровней концентраций), полученных методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией, также подтверждают вышеописанные различия рассматриваемых характеристик. На диаграмме для независимых выборок отмечается минимальное перекрытие доверительных интервалов относительной ошибки определения, а на диаграмме зависимых выборок – отсутствие перекрытия элементов диаграммы и смещение медианы выборки концентраций верапамила в область низких значений анализируемого параметра (рис. 14).

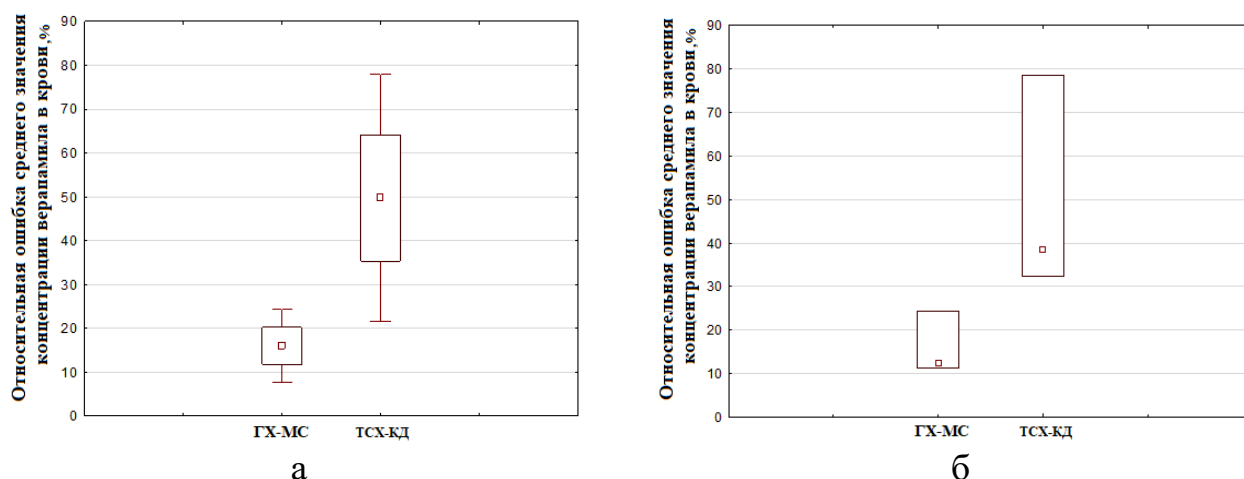


Рисунок 14 – Относительные ошибки средних значений концентраций верапамила в пробах крови, полученных методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией: для независимых выборок (а) и зависимых выборок (б).

В отличие от вышеописанного, при сравнении систематических ошибок определения δ концентрации верапамила в пробах крови (усредненных для трех уровней концентраций) методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией наблюдали другие тенденции. В ходе статистического анализа были установлены значимые различия систематических ошибок для рассматриваемых аналитических методов. Значения расчетных t -критериев равны 4,71 и 4,68 для независимых и зависимых выборок, что превышало табличные значения t -критериев 2,78 и 4,30 соответственно (табл. 17).

Таблица 17 – Результаты сравнения систематических ошибок определения концентрации верапамила в пробах крови методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией

Метод анализа	Систематическая ошибка определения δ , %	$t(P, f)$	$t_{эксн}$	p
Для независимых выборок				
ГХ-МС	8,40	2,78	4,71	0,0090
ТСХ-КД	25,43			
Для зависимых выборок				
ГХ-МС	8,40	4,30	4,68	0,043
ТСХ-КД	25,43			
- среднее значение для трех уровней концентраций верапамила в крови				

«Ящичные» диаграммы систематических ошибок определения концентрации верапамила в пробах крови методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией для независимых и зависимых выборок визуализируют статистическую значимость установленных различий.

При использовании алгоритма сравнения независимых выборок не наблюдали перекрытия доверительных интервалов анализируемого параметра, а при сравнении для зависимых выборок отмечали полное отсутствие перекрытия элементов на диаграмме, а также смещение медиан в область низких значений систематической ошибки определения для метода ГХ-МС и в область высоких – для ТСХ с компьютерной денситометрией (рис. 15).

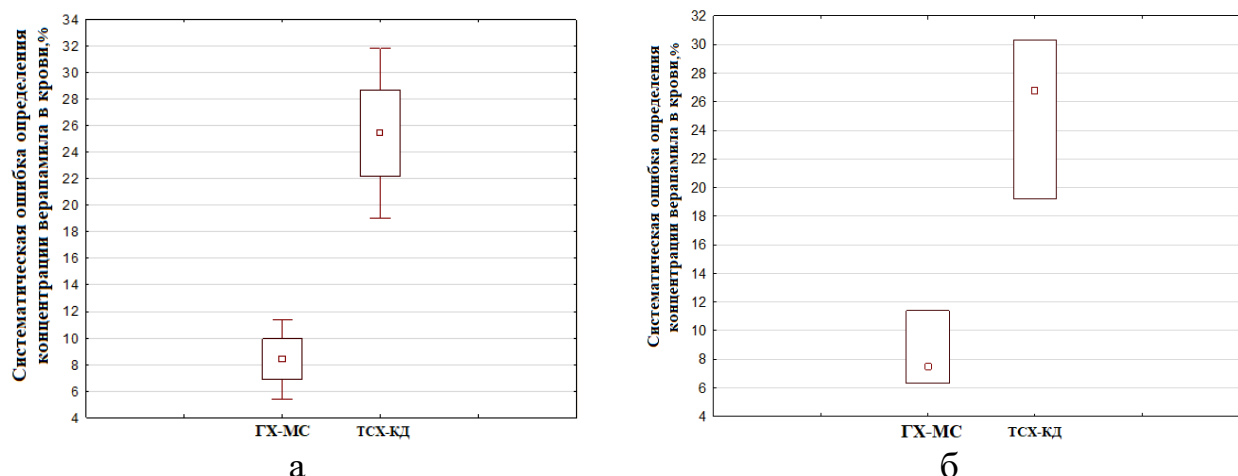


Рисунок 15 – Систематические ошибки определения концентрации верапамила в пробах крови методами GX-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией: для независимых (а) и зависимых выборок (б).

Результаты однофакторного дисперсионного анализа относительной ошибки среднего значения и систематической ошибки определения концентрации верапамила в пробах крови методами GX-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией, подтверждают статистически значимые различия для исследуемых параметров. Расчетные F -критерии данных метрологических характеристик имели значения, которые превышают табличное значение F -критерия (95%; 2; 3) – 9,55. Уровень значимости F -критериев для относительной ошибки среднего значения концентрации верапамила и систематической ошибки определения был менее 0,05 (табл. 18).

Таблица 18 – Результаты дисперсионного анализа относительной ошибки среднего значения и систематической ошибки определения концентрации верапамила в крови методами GX-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией

Параметры	Общая дисперсия выборки $SS_{\text{общ}}$	Дисперсия эффекта $MS_{\text{эф}}$	Дисперсия межгрупповая SS	Дисперсия ошибки $MS_{\text{ошиб}}$	F -критерий	Уровень значимости p
$\bar{\epsilon}_{\text{сред GX-МС}} / \bar{\epsilon}_{\text{сред ТСХ-КД}}$	1033,79	516,89	157,75	52,58	9,83	0,028
$\delta_{\text{GX-МС}} / \delta_{\text{ТСХ-КД}}$	38,80	19,40	5,76	1,92	10,10	0,017

Таким образом, на основании сравнительного статистического анализа метрологических характеристик методик количественного определения верапамила в крови, применяемых в судебно-химической экспертизе, получены следующие результаты:

- средние значения концентрации верапамила в модельных образцах крови при количественном определении методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией для уровней концентраций 500,0 нг/мл и 2000,0 нг/мл не различаются для используемых методов; на уровне концентрации верапамила в крови 5000,0 нг/мл наблюдается статистически значимое различие установленных концентраций: метод ТСХ с компьютерной денситометрией дает завышенные результаты анализа (до 23%) по сравнению с результатами ГХ-МС;

- относительные ошибки при определении среднего уровня концентрации верапамила в модельных образцах крови (усредненные для трех уровней концентрации), полученные при количественном определении методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией, статистически значимо различаются и составляют соответственно 16,01% и 49,77%;

- систематические ошибки определения концентрации верапамила в крови методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией статистически значимо различаются; результаты количественного анализа методом ГХ-МС имеют меньшее значение систематической ошибки (усредненное для трех уровней концентраций) – 8,40% по сравнению аналогичным показателем определения методом ТСХ с компьютерной денситометрией – 25,43%.

При оценке корреляционных зависимостей «относительная ошибка среднего значения - концентрация верапамила в крови» и «систематическая ошибка - концентрация верапамила в крови» установлено наличие умеренной связи между концентрацией верапамила и величиной относительной ошибки среднего значения, а в случае оценки систематической ошибки определения – практически отсутствие связи. Величины коэффициентов корреляции r составляют -0,41 (для относительной ошибки среднего значения) и 0,017 (для систематической ошибки).

Очевидно, что величина относительной ошибки среднего значения и систематической ошибки определений зависят от используемого аналитиком метода.

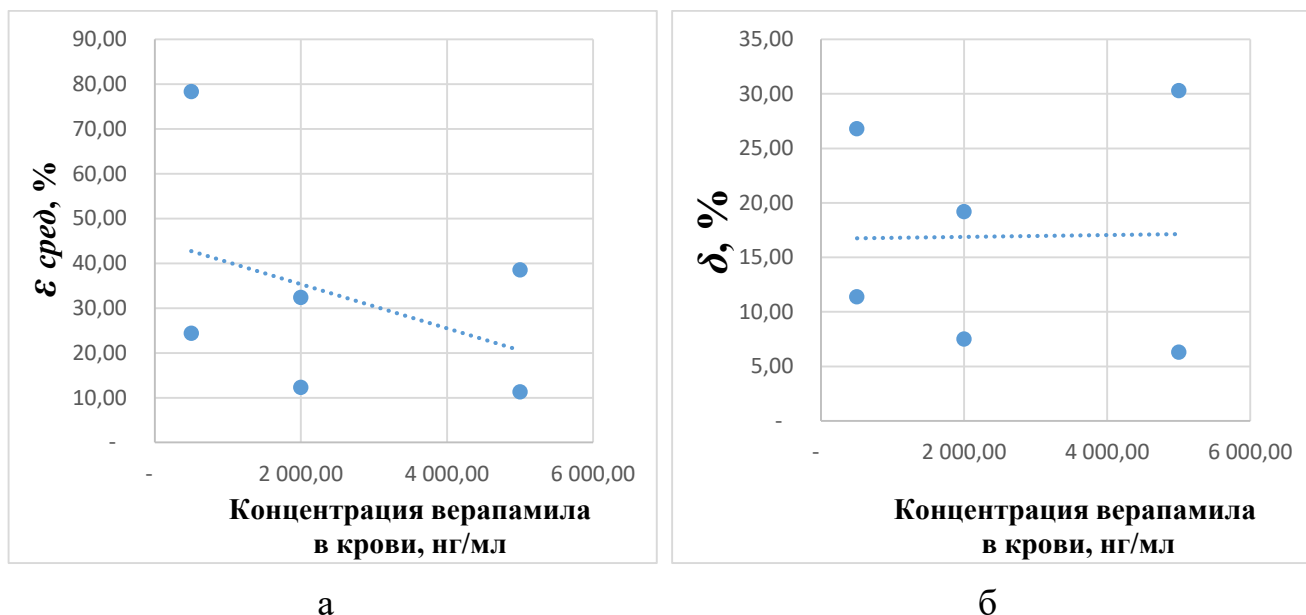


Рисунок 16 – Корреляционные зависимости «относительная ошибка среднего значения – концентрация верапамила в крови» (а) и «систематическая ошибка определения – концентрация верапамила в крови» (б).

Корреляционная зависимость «относительная ошибка среднего значения концентрация верапамила в крови» - «систематическая ошибка определения» при количественном определении концентрация верапамила методом ГХ-МС была достаточно высокой: величина коэффициента корреляции r составила 0,98. Для метода ТСХ с компьютерной денситометрией связь между исследуемыми параметрами была умеренная - значение коэффициента корреляции r 0,33 (рис. 17).

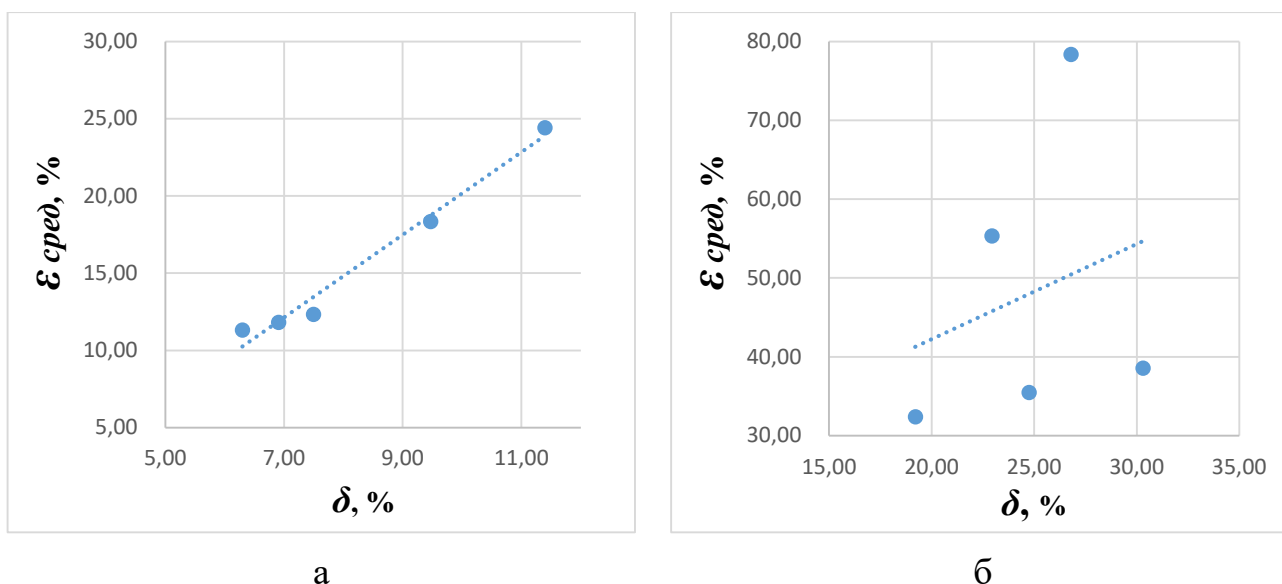


Рисунок 17 – Корреляционная зависимость «относительная ошибка среднего значения концентрации верапамила в крови» - «систематическая ошибка определения» при количественном определении концентрации верапамила в крови методами ГХ-МС (а) и ТСХ с компьютерной денситометрией (б).

Таким образом увеличение систематической ошибки определения содержания концентрации верапамила в крови в методе ГХ-МС приводит к практически линейному увеличению относительной ошибки среднего значения концентрации верапамила. В методе ТСХ с компьютерной денситометрией влияние систематической ошибки на общую ошибку определения было менее «жестким». Нелинейный рост относительной ошибки среднего значения верапамила в крови в данном случае связан с вкладом случайных ошибок.

Выводы по главе 4

1. Средние значения содержания диосмина в исследуемых лекарственных препаратах (образцах сравнения), определенные методом УФ-спектрофотометрии, статистически значимо не различаются для аналитических длин волн 268 нм и 370 нм; при количественном определении концентраций верапамила в модельных образцах крови (образцах сравнения), методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной

денситометрией, различие средних значений концентрации верапамила определяется уровнем его содержания в пробе.

2. Сравнение относительных ошибок определения среднего содержания диосмина и концентрации верапамила в образцах сравнения с использованием t -критерия и однофакторного дисперсионного анализа показывает их статистически значимые различия для применяемых вариантов УФ-спектрофотометрии: относительная ошибка для модификации методики с аналитической длины волны 268 нм на 30% больше ошибки методики с аналитической длины волны 368 нм; для разных хроматографических методов: относительная ошибка в методе ТСХ с компьютерной денситометрией была больше на 210% соответствующей ошибки метода ГХ-МС. Сравнительный статистический анализ систематических ошибок определения диосмина и верапамила в образцах сравнения имеет аналогичные закономерности: ошибка для методики с аналитической длиной волны 268 нм превышает на 105% ошибку альтернативной модификации, а ошибка методики на основе ТСХ с компьютерной денситометрией – на 212% ошибку ГХ-МС методики.
3. Анализ корреляционных зависимостей «относительная ошибка среднего значения» – «систематическая ошибка определения» показывает умеренный уровень связи между данными параметрами при УФ-спектрофотометрии диосмина (коэффициент корреляции r 0,35) и определении верапамила в модельных образцах крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией (коэффициент корреляции r 0,33); и высокий уровень связи – при количественном определении верапамила в крови методом ГХ-МС (коэффициент корреляции r 0,98).
4. Сравнение средних значений содержания анализируемого вещества для разных аналитических методик не является достаточным тестом для проверки наличия систематической погрешности. Целесообразно применять алгоритм, предполагающий последовательный статистический анализ относительной и систематической ошибок среднего значения содержания анализируемого вещества, а также исследовать их корреляционную зависимость.
5. На основании проведенного статистического анализа предполагается, что для исследуемых аналитических методик увеличение относительной ошибки

определения (суммарной погрешности) диосмина и верапамила в образцах сравнения связано с увеличением вклада случайных ошибок, в числе которых ошибки на этапе пробоподготовки образцов методами твердо-жидкостной и жидкость-жидкостной экстракции.

ГЛАВА 5. АЛГОРИТМЫ ОЦЕНКИ ПОГРЕШНОСТИ И ПЛАНИРОВАНИЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ (НА ПРИМЕРАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИОСМИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И ВЕРАПАМИЛА В КРОВИ)

Пробоподготовка как этап количественного анализа в значительной степени определяет метрологические характеристики аналитической методики в целом. Отсутствие единства методических подходов к реализации пробоподготовки и ее метрологической оценке приводит к большому разбросу результатов количественного определения лекарственных веществ спектральными, хроматографическими методами для часто встречаемых в практике анализируемых веществ в условиях конкретной лаборатории. Оптимизация процедуры жидкость-жидкостной экстракции и сорбции для ряда лекарственных веществ является одним из вариантов решения вышеуказанной проблемы.

В главе 4 нами был выполнен статистический анализ погрешностей определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в пробах крови. На основании результатов проведенного анализа предполагаем, что наибольший вклад в погрешность методик количественного определения вносят систематические и случайные ошибки на этапе пробоподготовки.

Погрешность пробоподготовки для аналитических методик определяли на основании двух входных величин:

- суммарной погрешности (суммарной ошибки) аналитической методики, определенной экспериментально;
- прогностической величины погрешности методики без учета вклада этапа пробоподготовки.

Для расчета прогностической погрешности методики без учета пробоподготовки использовали два алгоритма, основанные на применении следующих вариантов:

- компьютерной программы «ChemMetr Evaluation 1.0», которая оценивает погрешности измерения отдельных этапов аналитической методики («СМЕ-алгоритм»);

- уравнения Горвица – расчета погрешности на основании величины концентрации анализируемого вещества в пробе исследуемого объекта («алгоритм Горвица»).



Рисунок 18 – Дизайн исследования оценки погрешности пробоподготовки методик количественного определения в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе.

Полученные выборки погрешностей пробоподготовки проверяли на соответствие закону нормального распределения для дальнейшего анализа их

методами параметрической статистики: сравнения по t -критерию и однофакторного дисперсионного анализа (рис. 18).

5.1. Алгоритм оценки погрешности и планирования пробоподготовки для методики количественного определения диосмина в лекарственных препаратах методом УФ-спектрофотометрии

В качестве примера в таблице 19 представлены алгоритм и результаты прогностической оценки погрешности пробоподготовки методики количественного определения диосмина в «Детралекс®» 1000 мг таблетках. Ключевые параметры данного лекарственного препарата как образца сравнения: содержание диосмина 900,0 мг; масса таблетки 1,8492 г; концентрация диосмина 69,30% (мас.).

Относительная ошибка этапа пробоподготовки при использовании СМЕ-алгоритма составила 6,32%, что сопоставимо по величине с погрешностью УФ-спектрофотометрической методики без учета пробоподготовки – 6,56%. Относительная ошибка пробоподготовки, рассчитанная по алгоритму Горвица, равна 8,83%.

Таблица 19 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Детралекс®» таблетки 1000 мг; аналитическая длина волны 268 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_x	Относительная ошибка $(\sigma_x/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,8492 г	0,0002 г	0,010
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 268 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93

7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 268 нм	-	5,30
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}$, % (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			6,56
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}$, % (экспериментальная)			9,11
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}$, % (ChemMetr Evaluation 1.0)			6,32
Предел сходимости расчетный RSD_r , % (уравнение Горвица)			1,49
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}$, % (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,38
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}$, % (уравнение Горвица)			8,83

Для УФ-спектрофотометрической методики (при аналитических длинах волн 298 нм и 370 нм) при использовании всех лекарственных препаратов в качестве образцов сравнения были рассчитаны относительные ошибки $\varepsilon_{\text{сред}}$ определения среднего значения содержания диосмина без учета этапа пробоподготовки с применением двух вышеуказанных алгоритмов. Диапазоны величин данной ошибки (погрешности пробоподготовки) составили для СМЕ-алгоритма 5,08-7,63% и для алгоритма Горвица – 3,11-4,35% (табл. 20).

Следует предположить, что различия погрешностей пробоподготовки для данных алгоритмов связаны с их особенностями: алгоритм Горвица традиционно рассматривают как исключительно теоретическим и функционирует по принципу «черного ящика», где входной величиной является концентрация аналита в пробе, а выходная величина – это расчетный предел сходимости RSD_r , который исходя из принятого опорного значения концентрации для образца сравнения, мы пересчитывали в относительную ошибку $\varepsilon_{\text{сред}}$ конкретного этапа или всей аналитической методики.

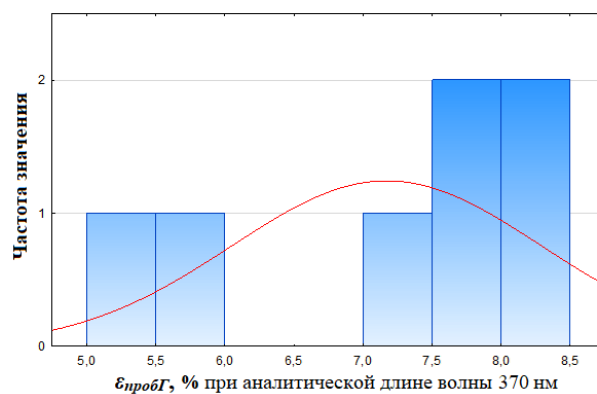
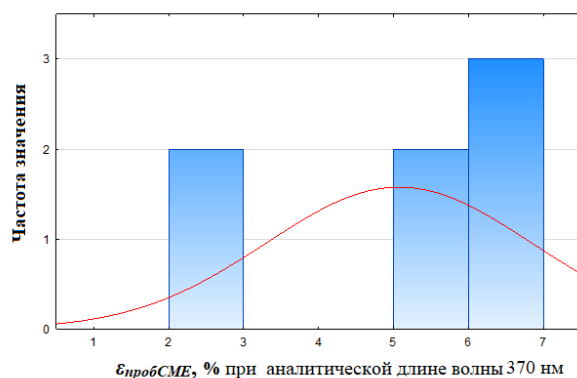
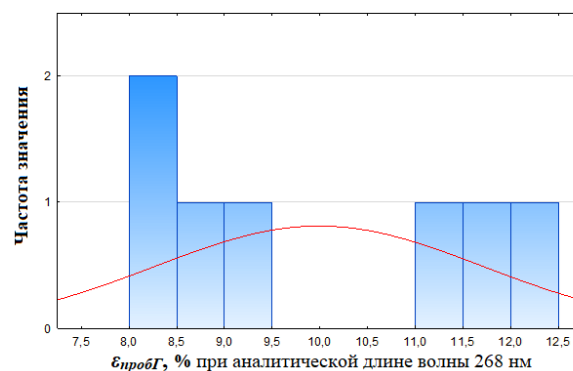
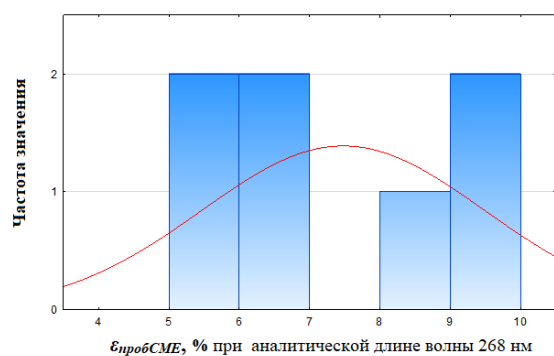
СМЕ-алгоритм является более «гибким», в нем заложена идеология учета предельного значения погрешностей каждого этапа аналитической методики с использованием метрологических характеристик мерной посуды, аналитического оборудования и других факторов.

Таблица 20 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии

Аналитическая длина волны, нм	$\varepsilon_{\text{сред}}$, %	$\varepsilon_{\text{средСМЕ}}$, %	$\varepsilon_{\text{средГ}}$, %	$\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}$, %	$\varepsilon_{\text{пробГ}}$, %
«Детралекс®» суспензия					
268	11,4	7,13	4,35	8,90	11,03
370	8,38	5,18	4,35	6,59	7,87
«Детралекс®» таблетки					
268	9,11	6,56	3,38	6,32	8,83
370	8,04	5,08	3,38	6,23	7,72
«Венарус®» таблетки					
268	9,52	6,76	3,21	6,70	9,28
370	8,34	5,47	3,21	6,30	8,07
«Флебофа®» таблетки					
268	12,48	7,63	3,13	9,88	12,31
370	8,35	5,98	3,13	5,83	8,09
«Детравенол®» таблетки					
268	8,57	6,69	3,10	5,36	8,32
370	6,09	5,41	3,10	2,80	5,74
«Флебавен®» таблетки					
268	8,51	6,61	3,11	5,36	8,26
370	5,80	5,33	3,11	2,29	5,42
«Флебодиа®» таблетки					
268	12,08	7,01	3,11	9,84	11,90
370	7,57	5,21	3,11	5,49	7,29

Обозначения: $\varepsilon_{\text{сред}}$ – экспериментальная относительная ошибка анализа (суммарная погрешность), %; $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}$ – относительная ошибка анализа без учета пробоподготовки, расчет «ChemMetr Evaluation 1.0», %; $\varepsilon_{\text{средГ}}$ – относительная ошибка анализа без учета пробоподготовки, расчет по уравнению Горвица, %; $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}$ – относительная ошибка пробоподготовки, расчет «ChemMetr Evaluation 1.0», %; $\varepsilon_{\text{пробГ}}$ – относительная ошибка пробоподготовки, расчет по уравнению Горвица, %.

Проверка выборки расчетных погрешностей пробоподготовки $\varepsilon_{\text{проб}}$ на соответствие закону нормального распределения данных показала, что для обоих методов расчета критерии Колмогорова-Смирнова имели значение больше 0,2 – соответственно распределение полученных данных нормальное (рис. 19). Это позволяет нам при проведении сравнительного статистического анализа реализовывать варианты параметрической статистики.



а

б

Рисунок 19 – Гистограммы распределения расчетных ошибок пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии: СМЕ-алгоритм (а) и алгоритм Горвица (б).

Сравнение средних значений ошибок пробоподготовки в УФ-спектрофотометрических методиках определения диосмина проводилось по t -критерию в двух вариантах: для зависимых выборок и независимых выборок.

Таблица 21 – Результаты сравнения погрешностей пробоподготовки в количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии при прогнозировании по СМЕ-алгоритму и алгоритму Горвица

Алгоритм /длина волны	Погрешность пробоподготов ки $\epsilon_{проб}$, %	Для независимых выборок			Для зависимых выборок		
		$t(P, f)$	$t_{эксн}$	p	$t(P, f)$	$t_{эксн}$	p
СМЕ-алгоритм/ 268 нм	7,48	2,18	2,51	< 0,05	2,45	19,38	< 0,05
Алгоритм Горвица/ 268 нм	9,99						
СМЕ-алгоритм/ 370 нм	5,07	2,18	2,64	< 0,05	2,45	7,79	< 0,05
Алгоритм Горвица/ 370 нм	7,17						

- среднее значение для всех образцов сравнения (лекарственных препаратов)

При сравнении погрешностей (ошибок) пробоподготовки для модификации УФ-спектрофотометрии при длине волны 268 нм установлено статистически значимое различие между данными полученными при использовании «ChemMetr Evaluation 1.0» и уравнения Горвица. Для независимых выборок t -критерий имел значение 2,51, для зависимых – 19,38, при этом табличные значения были 2,18 (для независимых выборок) и 2,45 (для зависимых выборок). Уровень их значимости p в обоих случаях имел величину менее 0,05.

Аналогичную закономерность – статистически значимое различие, наблюдали при сравнении ошибок пробоподготовки для модификации методики с аналитической длиной волны 370 нм.

Сравнение данных для СМЕ-алгоритма и алгоритма Горвица по t -критерию показало наличие статистических значимых различий: t -критерий принимал значение 2,64 при сравнении независимых выборок и 7,79 при сравнении зависимых выборок, табличные значения были 2,18 и 2,45 соответственно. Уровень значимости p для двух вариантов сравнения был менее 0,05.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа погрешности пробоподготовки для методики УФ-спектрофотометрического определения диосмина показывают наличие статистически значимых различий между погрешностями пробоподготовки, спрогнозированными по разным алгоритмам. Расчетный F -критерий (95%; 3; 24) имел значение 9,97, что превышало табличное значение F -критерия (95%; 3; 24) равное 3,01. Уровень значимости F -критерия в данном случае был менее 0,05.

Можно предположить, что алгоритм Горвица как способ расчета менее «гибкий» и не имеет отклика на факторную структуру пробоподготовки в отличие от алгоритма с применением компьютерной программы «ChemMetr Evaluation 1.0».

Таблица 22 – Результаты дисперсионного анализа погрешности пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии

Параметр	Общая дисперсия выборки $SS_{общ}$	Дисперсия эффекта $MS_{эф}$	Дисперсия межгрупповая SS	Дисперсия ошибки $MS_{ошиб}$	F-критерий	Уровень значимости p
$\varepsilon_{пробСМЕ} / \varepsilon_{пробГ}$	85,26	28,42	68,38	2,85	9,97	> 0,05

Полученные прогностические данные демонстрируют, что пробоподготовка является важным этапом количественного анализа и в значительной степени определяет метрологические характеристики всей аналитической методики.

Для уменьшения систематических и случайных ошибок в ходе пробоподготовки необходима оптимизация данного этапа с применением методов математического планирования.

Алгоритм оптимизации пробоподготовки включал следующие этапы:

- предварительное определение перечня факторов, определяющих эффективность экстракции, и уровней их варьирования (три уровня);
- генерация матрицы эксперимента – ключевым моментом данного этапа является адекватное формирование (баланс между позициями: «не потерять значимые факторы» и «получить рациональный объем реального эксперимента»);
- проведение эксперимента в соответствии с матрицей;
- построение математической модели экстракции;
- определение значимых факторов и их комбинаций, влияющих на эффективность экстракции;
- практические рекомендации по разработке методики пробоподготовки и ее апробация.

Очевидно, что пробоподготовка направлена на максимальное извлечение анализируемого вещества из пробы исследуемого объекта при минимальных трудо- и временных затратах, а также обеспечение воспроизводимости методики. В качестве параметра оптимизации выбрали эффективность экстракции диосмина из лекарственных препаратов (образцов сравнения).

Определение перечня факторов пробоподготовки и уровней их варьирования. Были выбраны основные факторы пробоподготовки, влияющие на параметр оптимизации:

- концентрация натрия гидроксида (экстрагент), моль/л;
- концентрация ацетонитрила (растворитель для разрушения мицеллярных структур диосмина для микронизированной фармацевтической субстанции), %;
- время экстракции, мин;
- время центрифугирования, мин;
- концентрация аммония сульфата (высаливающий реагент), %.

Уровни варьирования указанных факторов при проведении пробоподготовки представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Уровни варьирования факторов, влияющих на степень извлечения диосмина из лекарственных препаратов (образцов сравнения)

Фактор	Уровни варьирования		
	-1	0	+1
X_1 – концентрация раствора натрия гидроксида, моль/л	0,1	0,05	0,02
X_2 – концентрация ацетонитрила, % (от объема водной фазы)	50,0	25,0	-
X_3 – время экстракции, мин	5,0	10,0	20,0
X_4 – время центрифугирования, мин	5,0	10,0	20,0
X_5 – добавление электролита аммония сульфата, %	10,0	5,0	-

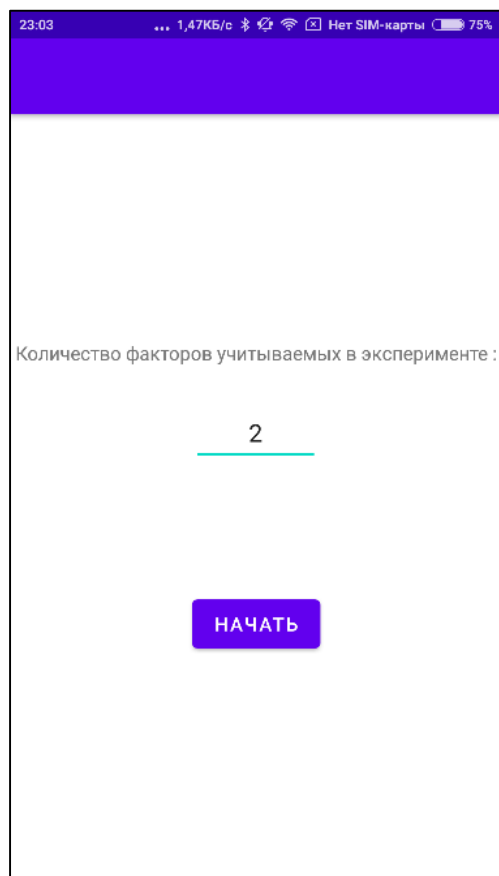
Генерация матрицы эксперимента. Оценку степени извлечения диосмина проводили по схеме многофакторного трехуровневого планирования экспериментов с применением плана Бокса-Бенкена (5 факторов, 2 блока, 46 опытов).

Одной из ключевых проблем в научных исследованиях и рутинной практике анализа является отсутствие у аналитиков компетенций формирования матрицы эксперимента для различных схем многофакторного планирования. Автоматизация

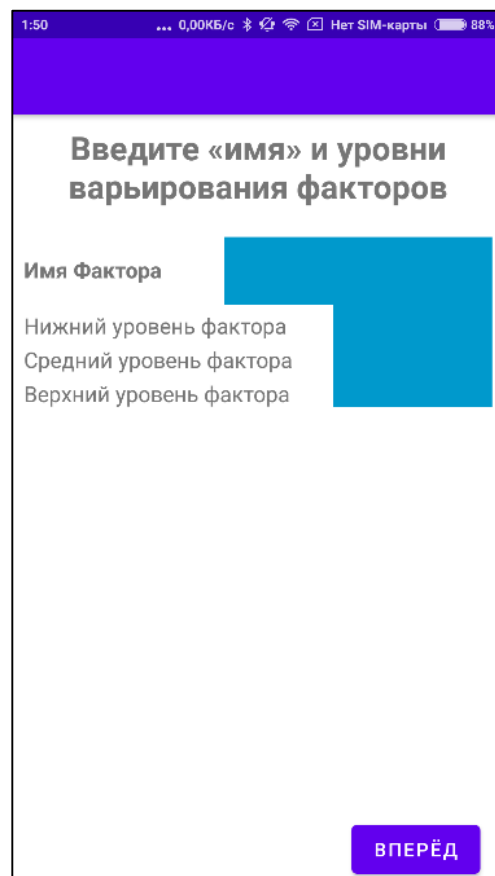
этого этапа необходима для широкомасштабного внедрения подходов математического планирования в рутинную аналитическую практику.

Нами была разработана компьютерная программа для ЭВМ «ChemPlan 1.0» (Приложение 3).

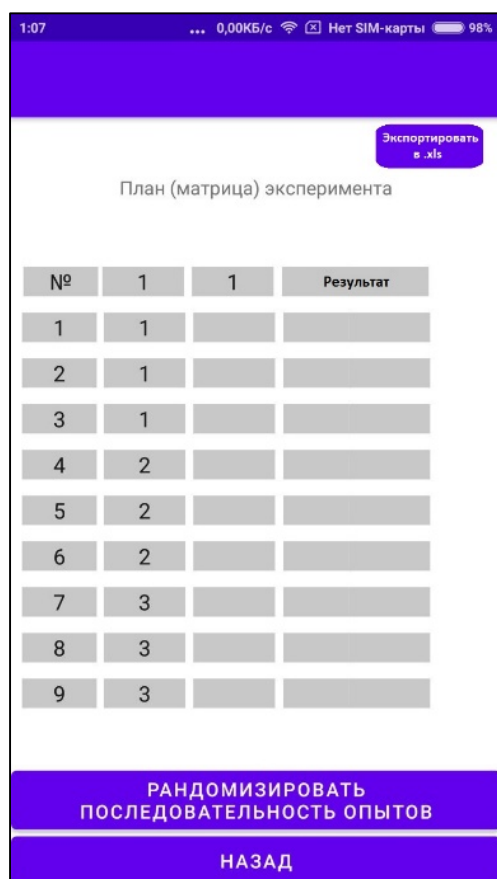
Поэтапное формирование матрицы эксперимента представлено на рисунке 20.



а



б



В

	Г	Н	И	Ж	К	Л	М	О
		X1	X2	X3	X4	X5	Проба 1%	Проба 2%
		0.02	50,00	10,00	10,00	5,00	92,10	85,10
		0.02	0,00	10,00	10,00	5,00	83,10	79,10
		0.02	25,00	5,00	10,00	5,00	89,82	78,50
		0.02	25,00	20,00	10,00	5,00	80,01	92,27
		0.02	25,00	10,00	5,00	5,00	87,20	95,47
		0.02	25,00	10,00	20,00	5,00	77,01	87,21
		0.02	25,00	10,00	10,00	10,00	81,13	81,38
		0.02	25,00	10,00	10,00	0,00	91,51	81,42
		0.05	25,00	5,00	5,00	5,00	76,70	57,01
		0.05	25,00	20,00	5,00	5,00	62,91	64,40
		0.05	25,00	5,00	20,00	5,00	66,12	62,32
		0.05	25,00	20,00	20,00	5,00	60,46	64,26
		0.05	50,00	10,00	10,00	10,00	72,96	59,36
		0.05	0,00	10,00	10,00	10,00	65,33	68,18
		0.05	50,00	10,00	10,00	0,00	73,33	61,74
		0.05	0,00	10,00	10,00	0,00	78,67	57,64
		0.05	25,00	10,00	5,00	10,00	68,36	69,43
		0.05	25,00	10,00	20,00	10,00	66,84	66,80
		0.05	25,00	10,00	5,00	0,00	74,92	67,59
		0.05	25,00	10,00	20,00	0,00	75,16	62,22
		0.05	25,00	10,00	10,00	5,00	66,77	65,66
		0.05	25,00	10,00	10,00	5,00	69,50	60,48
		0.05	25,00	10,00	10,00	5,00	68,45	72,89
		0.05	50,00	5,00	10,00	5,00	68,05	64,59
		0.05	0,00	5,00	10,00	5,00	70,34	67,65
		0.05	50,00	20,00	10,00	5,00	70,88	63,83
		0.05	0,00	0,00	20,00	10,00	69,75	57,42

Г

Рисунок 20 – Формирование матрицы эксперимента в компьютерной программе для ЭВМ «ChemPlan 1.0»: стартовое окно программы (а), окно определения уровня факторов (б), окно рандомизации (в), итоговый отчет программы (г).

При помощи данной компьютерной программы получали матрицу эксперимента (анализа) для твердо-жидкостной экстракции диосмина из лекарственных препаратов, состоящую из 46 опытов, на каждый из которых распространялось различное влияние уровня факторов.

Проведение эксперимента в соответствии с матрицей. В полученную матрицу вносили результаты эксперимента по твердо-жидкостной экстракции диосмина для каждого образца сравнения, таким образом формировался массив данных по степени извлечения диосмина из образцов сравнения. Для каждого лекарственного препарата были получены 2 блока данных по величинам степени извлечения.

В таблице 24 на примере образца сравнения – «Детралекс®» таблетки 1000 мг представлена матрица эксперимента и соответствующие ей блоки экспериментальных данных по степени извлечения диосмина методом твердо-жидкостной экстракции.

Аналогичные матрицы для всех образцов сравнения представлены в приложении 5.

Таблица 24 – Матрица эксперимента и экспериментальные данные по экстракции диосмина (на примере «Детралекс®» таблетки 1000 мг)

Факторы, влияющие на степень извлечения					Степень извлечения диосмина, %	
X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Блок №1	Блок №2
0,02	50,00	10,00	10,00	5,00	92,10	85,10
0,02	0,00	10,00	10,00	5,00	83,10	79,10
0,02	25,00	5,00	10,00	5,00	89,82	78,50
0,02	25,00	20,00	10,00	5,00	80,01	92,27
0,02	25,00	10,00	5,00	5,00	87,20	95,47
0,02	25,00	10,00	20,00	5,00	77,01	87,21
0,02	25,00	10,00	10,00	10,00	81,13	81,38
0,02	25,00	10,00	10,00	0,00	91,51	81,42
0,05	25,00	5,00	5,00	5,00	76,70	57,01
0,05	25,00	20,00	5,00	5,00	62,91	64,40
0,05	25,00	5,00	20,00	5,00	66,12	62,32
0,05	25,00	20,00	20,00	5,00	60,46	64,26
0,05	50,00	10,00	10,00	10,00	72,96	59,36
0,05	0,00	10,00	10,00	10,00	65,33	68,18
0,05	50,00	10,00	10,00	0,00	73,33	61,74
0,05	0,00	10,00	10,00	0,00	78,67	57,64
0,05	25,00	10,00	5,00	10,00	68,36	69,43
0,05	25,00	10,00	20,00	10,00	66,84	66,80
0,05	25,00	10,00	5,00	0,00	74,92	67,59
0,05	25,00	10,00	20,00	0,00	75,16	62,22
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	66,77	65,66
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	69,50	60,48
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	68,45	72,89
0,05	50,00	5,00	10,00	5,00	68,05	64,59
0,05	0,00	5,00	10,00	5,00	70,34	67,65
0,05	50,00	20,00	10,00	5,00	70,88	63,83
0,05	0,00	20,00	10,00	5,00	69,75	57,42
0,05	25,00	5,00	10,00	10,00	70,83	61,92
0,05	25,00	20,00	10,00	10,00	71,19	59,18
0,05	25,00	5,00	10,00	0,00	70,55	70,45
0,05	25,00	20,00	10,00	0,00	78,62	71,69

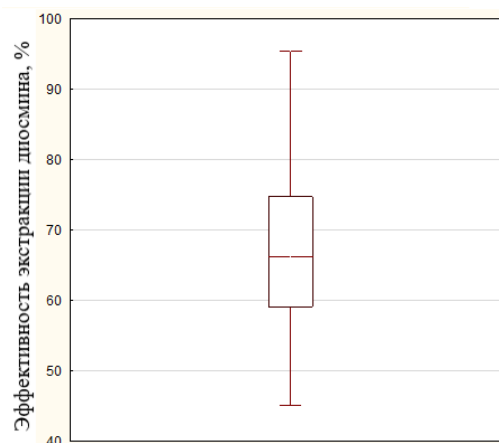
0,05	50,00	10,00	5,00	5,00	73,10	70,59
0,05	0,00	10,00	5,00	5,00	78,63	79,63
0,05	50,00	10,00	20,00	5,00	75,77	72,06
0,05	0,00	10,00	20,00	5,00	78,39	77,53
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	75,47	74,09
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	77,25	74,78
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	72,49	78,36
0,10	50,00	10,00	10,00	5,00	53,53	50,16
0,10	0,00	10,00	10,00	5,00	60,21	56,03
0,10	25,00	5,00	10,00	5,00	60,55	50,37
0,10	25,00	20,00	10,00	5,00	56,34	54,60
0,10	25,00	10,00	5,00	5,00	58,04	45,08
0,10	25,00	10,00	20,00	5,00	52,69	53,65
0,10	25,00	10,00	10,00	10,00	62,38	51,34
0,10	25,00	10,00	10,00	0,00	55,83	52,35

На рисунке 21 представлены средства визуальной оценки соответствия распределения массива данных эффективности экстракции диосмина закону нормального распределения на примере лекарственного препарата «Детралекс®» таблетки 1000 мг. Гистограмма распределения адекватно описывается кривой нормального распределения Гаусса, диаграмма разброса данных (медиана с интервалами нижнего и верхнего квартилей) симметрична.

Результаты эксперимента по определению степени извлечения диосмина в виде xls-файла экспортировали в модуль программы «Statistica 10.0»: «Таблица данных» - «Планирование экспериментов» - «Планы 3(К-р) и планы Бокса-Бенкена» - «Анализ эксперимента с трехуровневыми факторами».



а



б

Рисунок 21 – Гистограмма распределения (а), диаграмма разброса данных эффективности экстракции диосмина (б) на примере лекарственного препарата «Детралекс®» таблетки 1000 мг.

Построение математических моделей твердо-жидкостной экстракции.

Для получения математической модели процесса твердо-жидкостной экстракции диосмина выше были реализованы две повторности плана после его рандомизации.

В общем виде математическая модель, описывающая зависимость ключевого параметра оптимизации от значений влияющих факторов, описывается функцией $\omega = f(X_1, X_2, X_3, X_4, X_5)$. Для проверки уравнения регрессии рассчитаны коэффициенты множественной корреляции r , их значения варьировали в интервале от 0,8 до 0,9, что говорит о сильной связи между показателем эффективности экстракции диосмина и набором факторных показателей (рассматриваемых параметров твердо-жидкостной экстракции).

Статистическую надежность множественной регрессии оценивали с помощью F -критерия (критерия Фишера). Для нашего исследования табличный F -критерий (95%; 5; 40) имел значение 2,45. Полученные фактические значения F -критерия находились в пределах от 17,93 до 46,82.

Таким образом, в проведенном регрессионном анализе для экстракции диосмина все фактические значения F -критерия превышали табличное значение, это значит, что с вероятностью более 95% принимается гипотеза о том, что

полученные экспериментальные данные не являются случайными и сформированы под влиянием существенных факторов.

Величины коэффициентов детерминации r^2 для анализируемых образцов сравнения (лекарственных препаратов) находились диапазоне значений от 0,69 до 0,85, что интерпретируются как хорошее соответствие модели экспериментальным данным и говорит о высокой точности аппроксимации.

Значения выборочной дисперсии SS принимали значения в достаточно узком интервале – 4,00-6,82.

В таблице 25 приведены параметры, используемые для проверки достоверности моделей регрессии, описывающих экстракцию диосмина из лекарственных препаратов (образцов сравнения).

Таблица 25 – Статистические параметры для проверки достоверности регрессионных моделей экстракции диосмина из лекарственных препаратов

Образец сравнения	r	$F_{факт}$	r^2	p	SS
«Детралекс®» табл.	0,89	29,50	0,79	<0,05	4,66
	0,83	17,93	0,69	<0,05	6,82
«Детралекс®» суспензия.	0,88	27,56	0,77	<0,05	4,78
	0,82	16,55	0,67	<0,05	4,98
«Венарус®» табл.	0,84	18,63	0,70	<0,05	4,46
	0,86	22,81	0,74	<0,05	4,20
«Детравенол®» табл.	0,85	21,37	0,73	<0,05	4,00
	0,84	18,74	0,70	<0,05	4,42
«Флебавен®» табл.	0,92	46,82	0,85	<0,05	4,83
	0,92	45,44	0,85	<0,05	5,17
«Флебодиа®» табл.	0,87	25,56	0,76	<0,05	5,91
	0,85	21,33	0,73	<0,05	6,37
«Флебофа®» табл.	0,87	25,94	0,76	<0,05	5,80
	0,86	23,18	0,74	<0,05	5,52

Для получения математических регрессионных моделей был получен набор коэффициентов множественной линейной регрессии для каждого экспериментального блока данных по лекарственным препаратам, который представлен в таблице 26.

Таблица 26 – Коэффициенты уравнений множественной линейной регрессии для экстракции диосмина

Образец сравнения	Независимый член уравнения	K_1	K_2	K_3	K_4	K_5
«Детралекс®» табл.	100,74	-603,17	-0,14	0,47	0,0050	-0,92
	81,96	-749,83	0,12	2,52	-0,11	1,62
«Детралекс®» суспензия.	72,64	-27,66	0,04	-2,73	-3,55	-4,70
	64,41	-33,11	-1,59	1,73	-0,40	-0,69
«Венарус®» табл.	103,60	-761,04	-0,072	1,02	0,60	-0,091
	108,53	-754,35	0,16	-0,32	0,55	0,15
«Детравенол®» табл.	106,33	-687,66	-0,11	0,59	0,21	0,12
	118,39	-822,46	-0,080	-0,48	-0,51	0,270
«Флебавен®» табл.	106,58	-852,01	0,19	-0,32	1,15	-0,62
	122,24	-745,40	0,034	-0,34	-1,69	-0,11
«Флебодиа®» табл.	102,95	-998,76	0,066	1,12	-0,10	1,61
	125,96	-1156,33	0,29	-0,98	-0,53	-0,79
«Флебофа®» табл.	100,41	-1053,99	-0,16	1,56	1,10	0,52
	105,42	-925,95	0,19	0,081	0,50	-0,084

В качестве примеров ниже приведены уравнения множественной линейной регрессии (математические модели твердо-жидкостной экстракции) для «Детралекс®» таблетки 1000 мг, «Флебофа®» таблетки 600 мг и «Венарус®» таблетки 900 мг:

$$СИ_{Детралекс} = -603,17 \cdot X_1 - 0,14 \cdot X_2 + 0,47 \cdot X_3 + 0,0050 \cdot X_4 - 0,0050 \cdot X_5 + 100,74$$

$$СИ_{Флебофа} = -1053,99 \cdot X_1 - 0,16 \cdot X_2 + 1,56 \cdot X_3 + 1,10 \cdot X_4 + 0,52 \cdot X_5 + 100,41$$

$$СИ_{Венарус} = -761,04 \cdot X_1 - 0,072 \cdot X_2 + 1,02 \cdot X_3 + 0,60 \cdot X_4 - 0,091 \cdot X_5 + 103,60,$$

где СИ – степень извлечения (эффективность экстракции) диосмина, %;

X_1 - X_5 – факторы, влияющие на степень извлечения диосмина (табл. 23).

Определение значимых факторов, влияющих на эффективность экстракции. На основании представленных данных следует, что при твердо-жидкостной экстракции диосмина из всех лекарственных препаратов влияние

большинства исследуемых факторов на его степень извлечения практически отсутствует (или крайне малое).

Выраженное влияние на извлечение диосмина проявляет только фактор X_1 – концентрация раствора натрия гидроксида.

Для визуализации изучаемого процесса и представления взаимодействий факторов, определяющих эффективность экстракции диосмина, строили карты Парето для стандартизованных эффектов. На рисунке 22 представлены вышеуказанные карты для варианта экстракции диосмина из лекарственного препарата «Детралекс®» таблетки 1000 мг.

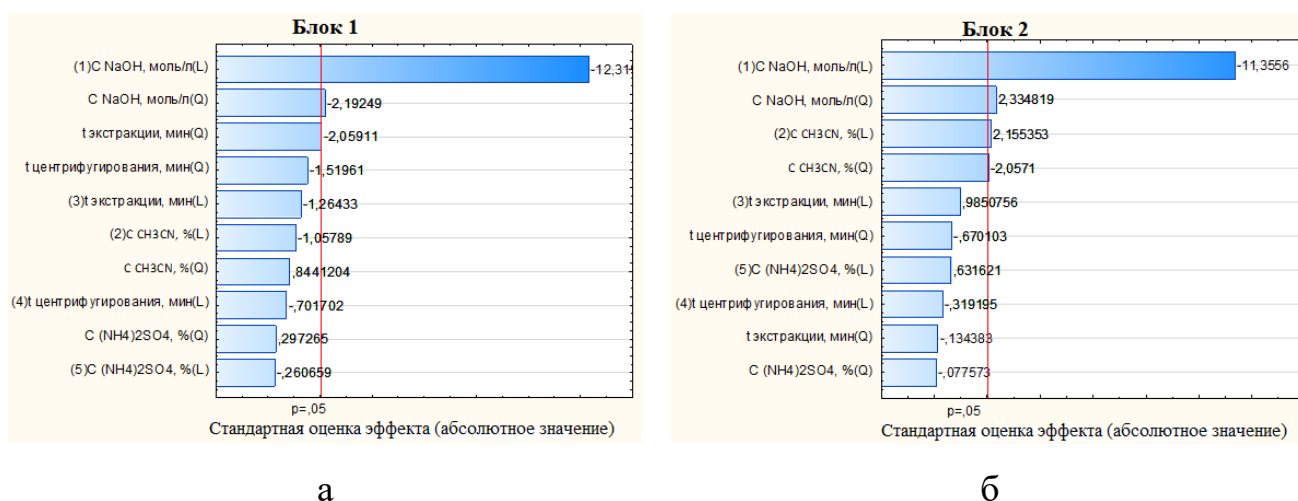


Рисунок 22 – Карты Парето стандартизованных эффектов для экстракции диосмина на примере лекарственного препарата «Детралекс®» таблетки 1000 мг (L – линейные эффекты, Q – квадратичные эффекты).

Из анализа представленных карт Парето следует, что изменение значения концентрации натрия гидроксида в экстрагенте ведет к значимому влиянию на величину эффективности экстракции диосмина, что подтверждает результаты множественного регрессионного анализа. Остальные эффекты (факторы экстракции) существенного влияния не оказывали.

Для визуализации математической модели влияния параметров экстракции и их различных комбинаций для изучаемого соединения получали графические изображения в виде поверхностей отклика и контурных диаграмм зависимости

эффективности экстракции от выбранных факторов (рис. 23). Поверхность данных диаграмм цветом наглядно демонстрирует градацию эффективности экстракции от уровня влияния факторов.

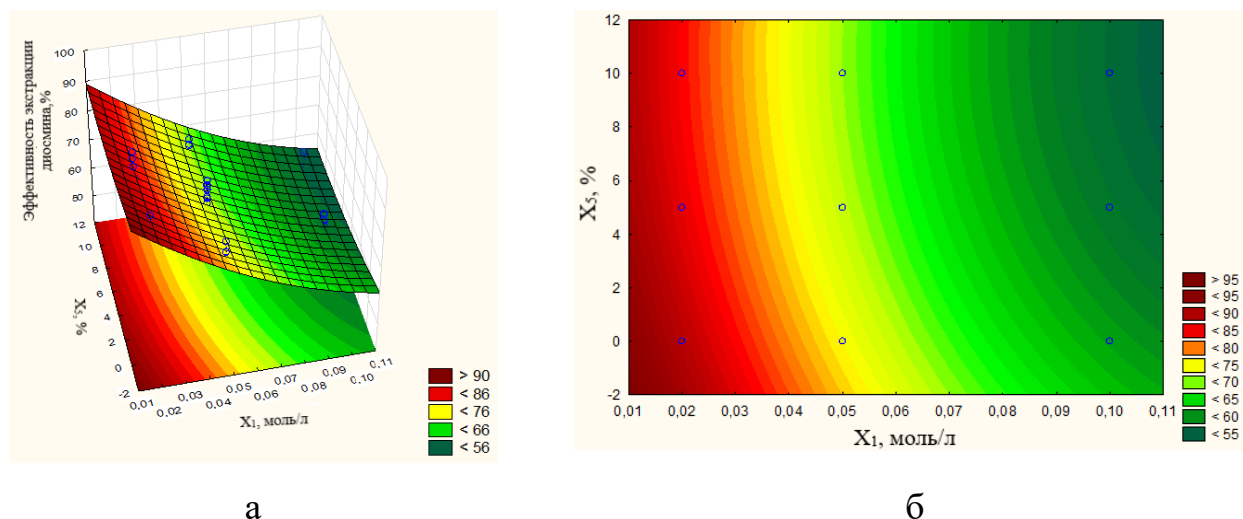


Рисунок 23 – Поверхность отклика (а) и контурная диаграмма (б) зависимости эффективности экстракции диосмина от факторов X_1 , моль/л и X_5 , % (на примере лекарственного препарата «Детралекс®» таблетки 1000 мг)

Из контурной диаграммы следует, что выраженное значение имеет концентрация раствора натрия гидроксида и с приближением ее значения к 0,02 моль/л растет эффективность экстракции диосмина. Дальнейшее увеличение концентрации натрия гидроксида приводит к снижению степени извлечения диосмина, что связано с меньшей гидрофильностью продуктов его щелочного гидролиза. Учет другого фактора, например, добавления высаливающего агента аммония сульфата, влияния на экстракцию не оказывало.

Итогом математического планирования и статистического анализа результатов, полученных в соответствии с планом эксперимента, является оптимальное значение ключевого параметра экстракции – концентрации натрия гидроксида – 0,02 моль/л; значения факторов: время экстракции и центрифугирования должны иметь минимальное значение – 5 мин, целесообразность добавления ацетонитрила и аммония сульфата отсутствует.

Практические рекомендации по методике пробоподготовки лекарственных препаратов. Полученные результаты по реализации алгоритма планирования по схеме многофакторного трехуровневого эксперимента с применением плана Бокса-Бенкена (при помощи программы «ChemPlan 1.0») по моделированию экстракции целевого анализируемого соединения и статистической обработки экспериментальных данных имеют универсальный характер и могут применяться для оптимизации процедуры анализа в контроле качества других лекарственных средств.

Преимуществами предложенного алгоритма являются научная обоснованность подхода, относительная экспрессность, упрощение этапа оптимизации пробоподготовки аналитических методик за счет автоматизации расчетов. Разработанный алгоритм апробирован и внедрен в аналитическую практику отделов контроля качества фармацевтических предприятий ООО «Самарская фармацевтическая фабрика» и ООО «Лекарь» (Приложение 2), а также внедрен в учебный процесс в Башкирском государственном медицинском университете (Приложение 2).

5.2. Алгоритм оценки погрешности и планирования пробоподготовки для методик количественного определения верапамила в крови, применяемых в судебно-химической экспертизе

При реализации данных алгоритмов для методик количественного определения верапамила в крови методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией также были выполнены прогностические оценки погрешности этапа пробоподготовки, результаты приведены в таблицах 27 и 28.

Таблица 27 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении верапамила в крови методом ГХ-МС

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_x	Относительная ошибка $(\sigma_x/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 5 мл	0,5	10
2.	Жидкость-жидкостная экстракция	-	-
3.	Дозирование пробы 2 мкл	-	0,4
4.	Измерение площади пика верапамила (хроматограф Agilent 5890)	-	3,0
5.	Измерение площади пика ВС (хроматограф Agilent 5890)	-	3,0
6.	Погрешность градуировки	-	8,0
7.	Погрешность концентрации ВС	-	1,0
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0) для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл/			20,11/11,23/10,25
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная) для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл/			24,41/12,34/11,31
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0) для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл			13,84/5,10/4,78
Предел сходимости расчетный $\text{RSD}_r, \%$ (уравнение Горвица): для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл/			8,41/6,83/5,95
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица) для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл			21,62/17,55/15,29
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица) для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл			7,95/13,49/11,35

Таблица 28 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении верапамила в крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_x	Относительная ошибка $(\sigma_x/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 10 мл	0,1	1,0
2.	Жидкость-жидкостная экстракция	-	-
3.	Дозирование пробы 50 мкл (дозатор полуавтоматический)	-	5,0
4.	Степень извлечения верапамила	-	7,0
5.	Измерение площади пятна (ТСХ-менеджер)	-	5,0
6.	Погрешность градуировки	-	10,0
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0) для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл/			18,95/16,09/15,03

Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}$, % (экспериментальная) для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл/	78,39/32,38/38,55
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}$, % (ChemMetr Evaluation 1.0) для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл	76,06/28,10/35,50
Предел сходимости расчетный RSD_r , % (уравнение Горвица): для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл/	8,41/6,83/5,95
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}$, % (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица) для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл	21,62/17,55/15,29
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}$, % (уравнение Горвица) для 500 нг/мл/для 2000 нг/мл/для 5000 нг/мл	10,41/7,01/2,81

При использовании прогностических алгоритмов расчета ошибки среднего значения содержания верапамила в крови установлено, что значения ошибок (без учета пробоподготовки) по СМЕ-алгоритму находились в диапазонах 10,25-20,11% и 15,03-18,95% (для ГХ-МС и ТСХ-КД соответственно), по алгоритму Горвица в диапазоне 15,29-21,62% для обоих методов (таб. 28). Данные расчеты подтверждают предположение, что для прогнозирования погрешности методики использование одного лишь уравнения Горвица является недостаточным.

Таблица 28 – Результаты сравнения ошибок пробоподготовки определения концентрации верапамила в пробах крови методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией при использовании ChemMetr 1.0 и уравнения Горвица

μ , нг/мл	$\varepsilon_{\text{сред}}$, %	$\varepsilon_{\text{средСМЕ}}$, %	$\varepsilon_{\text{средГ}}$, %	$\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}$, %	$\varepsilon_{\text{пробГ}}$, %
ГХ-МС					
500,0	24,41	20,11	21,62	13,84	7,95
2000,0	12,34	11,23	17,55	5,10	13,49
5000,0	11,31	10,25	15,29	4,78	11,35
ТСХ-КД					
500,0	78,39	18,95	21,62	76,06	10,41
2000,0	32,38	16,09	17,55	28,10	7,01
5000,0	38,55	15,03	15,29	35,50	2,81

Обозначения: $\varepsilon_{\text{сред}}$ – экспериментальная относительная ошибка анализа (суммарная погрешность), %; $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}$ – относительная ошибка анализа без учета пробоподготовки, расчет «ChemMetr Evaluation 1.0», %; $\varepsilon_{\text{средГ}}$ – относительная ошибка анализа без учета пробоподготовки, расчет по уравнению Горвица, %; $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}$ – относительная ошибка пробоподготовки, расчет «ChemMetr Evaluation 1.0», %; $\varepsilon_{\text{пробГ}}$ – относительная ошибка пробоподготовки, расчет по уравнению Горвица, %.

Диапазоны величин погрешности пробоподготовки для методики ГХ-МС составили для СМЕ-алгоритма 4,78-13,84% и для алгоритма Горвица – 7,95-13,49%. В методике ТСХ с компьютерной денситометрией диапазоны СМЕ-алгоритма составляли 28,10-76,06%, диапазона алгоритма Горвица – 2,81-10,41%. Различия расчетных погрешностей для двух аналитических методик с практически одинаковой процедурой пробоподготовки вызывает сомнения в адекватности применяемых расчетных алгоритмов.

При проверке выборки погрешностей пробоподготовки $\varepsilon_{проб}$ на соответствие закону нормального распределения данных установлено, что для обоих методов расчета критерий Колмогорова-Смирнова принимал значения больше 0,2, что подтверждает соответствие данному закону (рис. 24).

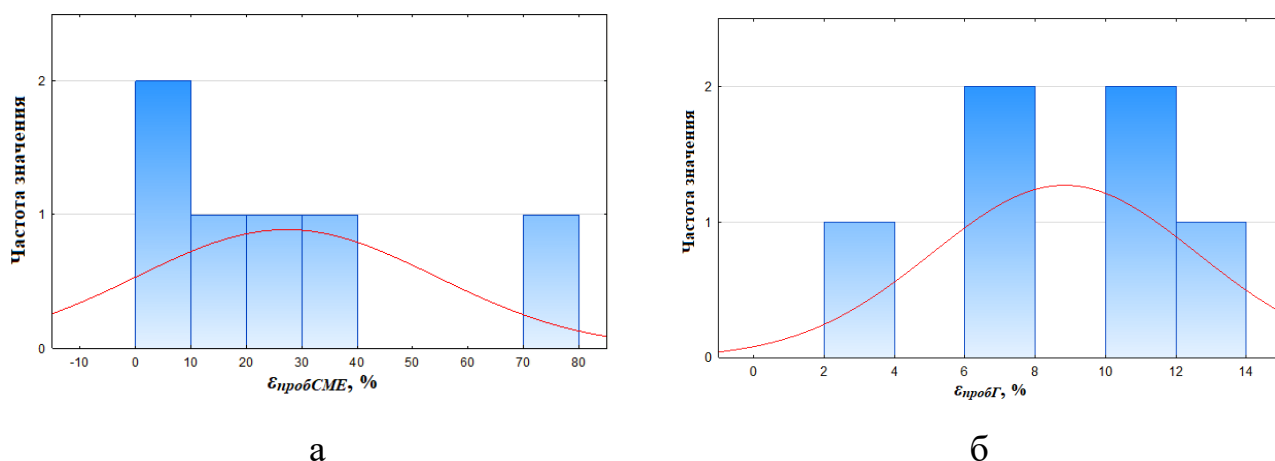


Рисунок 24 – Гистограммы распределения расчетных ошибок пробоподготовки определения концентрации верапамила в пробах крови методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией: СМЕ-алгоритм (а) и алгоритм Горвица (б).

Наличие статистически значимых различий для зависимых и независимых выборок по t -критерию было обнаружено на стадии сравнения ошибок пробоподготовки проб крови при анализе методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией разными прогностическими алгоритмами. Значения t -критериев были 4,64 и 4,17 при использовании СМЕ-алгоритма, 2,81 и 3,07 при использовании

алгоритма Горвица. Справочные значения t -критериев 2,1 и 2,26 (уровень значимости p в обоих случаях менее 0,05) (табл. 29).

При реализации СМЕ-алгоритма расчетная погрешность для ГХ-МС методики в 6 раз меньше по сравнению с погрешностью пробоподготовки в методике, основанной на ТСХ с компьютерной денситометрией; при реализации алгоритма Горвица - в 1,6 раза больше по сравнению с методикой ТСХ с компьютерной денситометрией.

Таблица 29 – Результаты сравнения погрешностей пробоподготовки в количественном определении верапамила крови методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией при прогнозировании по СМЕ-алгоритму и алгоритму Горвица

Алгоритм	Метод	Погрешность среднего значения пробоподготовки $\varepsilon_{проб}, \%$	$t(P, f)$	$t_{экср}$	p
СМЕ- алгоритм	Для независимых выборок				
	ГХ-МС	7,91	2,10	4,64	< 0,05
	ТСХ-КД	46,55			
	Для зависимых выборок				
	ГХ-МС	7,91	2,26	4,17	< 0,05
ТСХ-КД	46,55				
Алгоритм Горвица	Для независимых выборок				
	ГХ-МС	10,93	2,10	2,81	< 0,05
	ТСХ-КД	6,74			
	Для зависимых выборок				
	ГХ-МС	10,93	2,26	3,07	0,01
ТСХ-КД	6,74				
- среднее значение для трех уровней концентраций верапамила в крови					

При сравнении прогностических ошибок пробоподготовки анализа верапамила в пробах крови методом ГХ-МС статистически значимое различие между данными полученными при использовании СМЕ-алгоритма и алгоритма Горвица не установлено. Для независимых выборок t -критерий имел значение 1,63, для зависимых – 1,42, при справочных значениях – 2,26 и 2,1 для не зависимых и зависимых выборок соответственно (табл. 30).

Таблица 30 – Результаты сравнения погрешностей пробоподготовки в количественном определении верапамила крови методом ГХ-МС при прогнозировании по СМЕ-алгоритму и алгоритму Горвица

Алгоритм расчета	Погрешность среднего значения пробоподготовки $\varepsilon_{проб}, \%$	$t(P, f)$	$t_{эксп}$	p
Для независимых выборок				
СМЕ-алгоритм	7,91	2,10	1,63	< 0,05
Алгоритм Горвица	10,93			
Для зависимых выборок				
СМЕ-алгоритм	7,91	2,26	1,42	< 0,05
Алгоритм Горвица	10,93			
- среднее значение для трех уровней концентраций верапамила в крови				

Ситуацию отличную от описанной выше наблюдали при сравнении ошибок пробоподготовки анализа верапамила в пробах крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией: t - критерий для независимых выборок имел значение 4,84, для зависимых 4,71 при справочных значениях t - критерия 2,26 и 2,1, уровень значимости p для обоих вариантов анализа менее 0,05 (таб. 31)

Таблица 31 – Результаты сравнения погрешностей пробоподготовки в количественном определении верапамила крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией при прогнозировании по СМЕ-алгоритму и алгоритму Горвица

Алгоритм расчета	Погрешность среднего значения пробоподготовки $\varepsilon_{проб}, \%$	$t(P, f)$	$t_{эксп}$	p
Для независимых выборок				
СМЕ-алгоритм	46,55	2,10	4,82	< 0,05
Алгоритм Горвица	6,74			
Для зависимых выборок				
СМЕ-алгоритм	46,55	2,26	4,71	< 0,05
Алгоритм Горвица	6,74			
- среднее значение для трех уровней концентраций верапамила в крови				

Однофакторный дисперсионный анализ погрешности пробоподготовки при определении содержания верапамила в пробах крови методами ГХ-МС и ТСХ с компьютерной денситометрией определяет наличие статистически значимых различий при использовании разных алгоритмов расчета (табл. 32). Расчетный F -критерий (95%; 1; 38) имел значение 9,19, которое превышало табличное значение

F -критерия (95%; 1; 38) равно 4,08. Уровень значимости F -критерия в данном случае был менее 0,05.

Таблица 32 – Результаты дисперсионного анализа погрешности пробоподготовки при количественном определении верапамила в крови методами ГХ-МС и ТСХ-с компьютерной денситометрией

Параметр	Общая дисперсия выборки $SS_{общ}$	Дисперсия эффекта $MS_{эф}$	Дисперсия межгрупповая SS	Дисперсия ошибки $MS_{ошиб}$	F -критерий	Уровень значимости p
$\varepsilon_{пробСМЕ} / \varepsilon_{пробГ}$	3383,76	3383,76	13991,56	368,20	9,19	< 0,05

Таким образом расчетный алгоритм оценки погрешности пробоподготовки с применением компьютерной программы «ChemMetr Evaluation 1.0» (СМЕ-алгоритм) мы считаем наиболее предпочтительным к применению, его преимуществом является учет предельных значений погрешностей каждого этапа аналитической методики.

Оптимизация процедуры пробоподготовки в количественном определении верапамила крови реализована по схеме, описанной в главе 5.1.

Определение перечня факторов и уровней их варьирования.

Основные факторы, влияющие на процесс жидкость-жидкостной экстракции верапамила из пробы крови:

- значение рН водной фазы;
- соотношение хлороформ - н-бутанол в экстрагенте;
- время экстракции, мин;
- время центрифугирования, мин;
- добавление электролита натрия хлорида, %;
- соотношение объемов пробы и экстрагента.

Уровни варьирования факторов пробоподготовки указаны в таблице 33.

Таблица 33 – Уровни варьирования факторов, влияющих на степень извлечения верапамила из образцов крови

Фактор	Кодированные уровни		
	-1	0	+1
X_1 – значение pH водной фазы	7,0	9,0	11,0
X_2 – соотношение хлороформ - н-бутанол в экстрагенте	9:1	7:3	-
X_3 – время экстракции, мин	2,0	5,0	10,0
X_4 – время центрифугирования, мин	5,0	10,0	20,0
X_5 – добавление электролита натрия хлорида, %	10,0	5,0	-
X_6 – соотношение объемов пробы и экстрагента	1:1	1:2	2:1

Генерация матрицы эксперимента.

В программе для ЭВМ «ChemPlan 1.0» была получена матрица эксперимента, включающая 54 опыта. Оценку степени экстракции верапамила проводили по схеме многофакторного трехуровневого планирования эксперимента с применением плана Бокса-Бенкена (6 факторов, 1 блок, 54 опыта).

Проведение эксперимента в соответствии с матрицей. Результаты эксперимента жидкость-жидкостной экстракции вносили в полученную матрицу и формировали массивы данных по степени экстракции верапамила из крови (Приложение 5). Результаты анализа также обрабатывались при помощи программы «Statistica 10.0».

Статистические характеристики данных степени извлечения верапамила из проб крови представлены в таблице 35. Стоит отметить, что в процессе анализа были допущены грубые ошибки (промахи). После исключения их из исследуемого массива выборка стала больше соответствовать закону нормального распределения данных. Уровень значимости критерия Колмогорова-Смирнова p составил более 0,2, что подтверждает ранее описанное заключение.

Таблица 34 – Статистические характеристики данных эффективности экстракции верапамила из крови

Выборка	Объем выборки n	Среднее значение $x_{сред}$	Медиана m	Стандартное отклонение S	Асимметрия	Эксцесс	Уровень значимости p критерия Колмогорова-Смирнова
до исключения промахов	54	78,88	79,82	9,00	-0,78	0,33	>0,2
после исключения промахов	48	81,17	80,56	6,45	-0,17	-0,16	>0,2

Построение математических моделей жидкость-жидкостной экстракции.

В случае экстракции верапамила из крови методом жидкость-жидкостной экстракции математическая модель, описывающая зависимость параметра оптимизации от значащих факторов представляется функцией $\omega = f(X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6)$. Коэффициент множественной корреляции r имел значение 0,73, что описывает связи между показателем эффективности экстракции верапамила и набором факторных показателей (параметров жидкость-жидкостной экстракции) как сильную.

Величина коэффициента детерминации r^2 для анализируемой выборки составляла 0,53, что говорит о хорошем соответствии модели экспериментальным данным.

При сравнении фактического значения F -критерия с табличным при заданном уровне значимости установлено, что с вероятностью 95% полученные данные не являются случайными и сформированы под влиянием существенных факторов: значение $F_{факт}$ составило 2,31, в то время как справочное $F_{табл}$ (95%; 6 ; 48) имеет значение 2,29.

Установив состоятельность модели жидкость-жидкостной экстракции верапамила из проб крови вышеописанными тестами выведено уравнение множественной линейной регрессии:

$$\omega = 74,55 + 0,71 \cdot X_1 - 0,087 \cdot X_2 - 0,19 \cdot X_3 + 0,048 \cdot X_4 + 0,13 \cdot X_5 + 0,23 \cdot X_6,$$

где ω – степень извлечения верапамила из пробы крови.

Определение значимых факторов, влияющих на эффективность экстракции. Из представленного уравнения следует, что при жидкость-жидкостной экстракции наиболее выраженное влияние на извлечение верапамила оказывает только фактор X_1 – значение рН водной фазы.

Выполнив визуализацию уравнения с помощью карты Парето для стандартизованных эффектов мы подтверждаем значимое влияние значения рН водной фазы на эффективность экстракции верапамила (рисунок 25).



Рисунок 25 – Карта Парето стандартизованных эффектов для экстракции верапамила из проб крови (L – линейные эффекты, Q – квадратичные эффекты)

При анализе поверхности отклика и контурной диаграммы установлено, что сочетание значений рН водной фазы 9,5-10,0 и добавление натрия хлорида в диапазоне концентраций 4-6% обеспечивает максимальную степень извлечения верапамила из проб крови (рисунок 26). Факторы: время экстракции и время центрифугирования должны иметь минимальное значение; соотношение объемов пробы и экстрагента, соотношение хлороформ - н-бутанол в экстрагенте в пробоподготовке значимого влияния не оказывают.

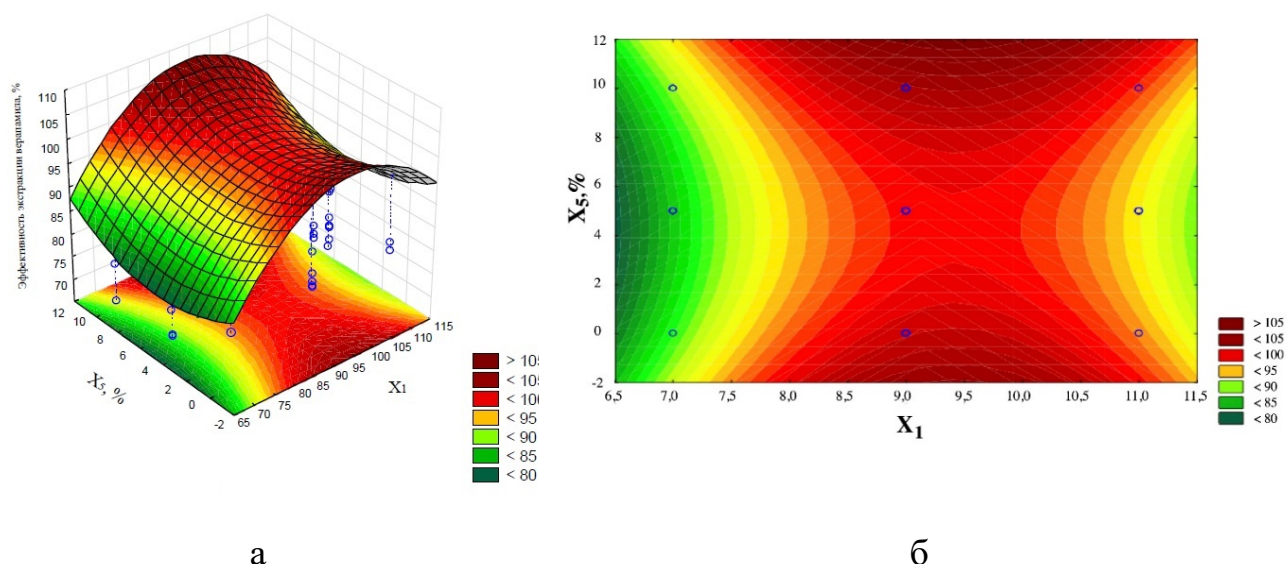


Рисунок 26 – Поверхность отклика (а) и контурная диаграмма (б) зависимости эффективности экстракции верапамила от факторов X_1 и X_5 , %

Практические рекомендации по методике пробоподготовки аналита методом жидкость-жидкостной экстракции. Разработанный алгоритм апробирован и внедрен в работу судебно-химического отделения Филиала №3 (г. Самара) ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России, а также внедрен в учебный процесс в Пермской государственной фармацевтической академии и Курском государственном медицинском университете (Приложение 2).

Таким образом на основании проведенных исследований нами разработан алгоритм планирования и оптимизации пробоподготовки для методик количественного определения в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе на примере определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в крови.



Рисунок 27 – Алгоритм планирования и оптимизации пробоподготовки методик количественного определения в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе.

Выводы по главе 5

1. Предложен алгоритм оценки погрешности этапа пробоподготовки с применением компьютерной программы «ChemMetr Evaluation 1.0» и уравнения Горвица для методик количественного определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в крови. Сравнительный статистический анализ данного алгоритма с алгоритмом, основанным на применении уравнения Горвица, показал его «гибкость», связанную с учетом предельных погрешностей каждого этапа аналитической методики.
2. Разработан алгоритм планирования и оптимизации пробоподготовки, основанный на многофакторном планировании эксперимента по схеме Бокса-Бенкена, на примерах определения диосмина в лекарственных препаратах и

верапамила в крови. Данный алгоритм имеет универсальный характер и может применяться для оптимизации процедуры анализа в контроле качества других лекарственных средств и судебно-медицинской экспертизе.

3. Разработана компьютерная программа для ЭВМ «ChemPlan 1.0», которая автоматически формирует матрицу по планированию и оптимизации пробоподготовки, исходя из перечня и уровня факторов, влияющих на эффективность экстракции.

4. Получены математические модели твердо-жидкостной диосмина из лекарственных препаратов и жидкость-жидкостной экстракции верапамила из проб крови, имеющие форму уравнений множественной линейной регрессии. Данные уравнения позволяют определять наиболее значимые факторы, влияющие на степень извлечения анализируемых веществ, и являются основой для визуализации результатов статистического анализа.

5. Разработанный алгоритм планирования и оптимизации пробоподготовки апробирован и внедрен в работу отделов контроля качества фармацевтических предприятий ООО «Самарская фармацевтическая фабрика» и ООО «Лекарь», судебно-химического отделения Филиала №3 ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России, а также внедрен в учебный процесс в Пермской государственной фармацевтической академии, в Башкирском государственном медицинском университете и Курском государственном медицинском университете.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. С применением в качестве образцов сравнения лекарственных препаратов на основе фармацевтической субстанции диосмина определены метрологические характеристики методик его количественного определения методом УФ-спектрофотометрии с расчетом по удельным показателям поглощения при длинах волн 268 нм и 370 нм. Относительная ошибка определения среднего значения содержания диосмина не превышала 12,0%, правильность (систематическая ошибка) – не более 6,0%. Методика количественного определения верапамила в крови методом УФ-спектрофотометрии характеризуется показателями правильности и прецизионности не превышающими значения 27,5% и 7,4% соответственно, при этом ее рабочий диапазон концентраций – 10,0-150,0 мкг/мл. Правильность и прецизионность количественного определения верапамила в крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием составляют соответственно 6,3-11,4% и 4,4-9,5% для диапазона концентраций 50,0-5000,0 нг/мл. Аналогичные показатели в интервале концентраций верапамила 300,0-5000,0 нг/мл для методики, основанной на тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией, равны 19,2-30,3% и 7,5-30,5%.

2. Сравнение относительных ошибок определения (суммарной погрешности) среднего содержания диосмина и верапамила в образцах сравнения показывает их статистически значимые различия для применяемых вариантов УФ-спектрофотометрии: относительная ошибка для модификации методики с аналитической длиной волны 268 нм на 30% больше ошибки методики с аналитической длиной волны 368 нм; для разных хроматографических методов: относительная ошибка в методе ТСХ с компьютерной денситометрией была больше на 210% соответствующей ошибки метода ГХ-МС. Сравнительный статистический анализ систематических ошибок определения диосмина и верапамила в образцах сравнения имеет аналогичные закономерности: ошибка для методики с аналитической длиной волны 268 нм превышает на 105% ошибку альтернативной модификации, а ошибка методики на основе ТСХ с компьютерной денситометрией – на 212% ошибку ГХ-МС методики.

3. Анализ корреляционных зависимостей «относительная ошибка среднего значения» – «систематическая ошибка определения» показывает умеренный уровень связи между данными параметрами при УФ-спектрофотометрии диосмина (коэффициент корреляции r 0,35) и определении верапамила в модельных образцах крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией (коэффициент корреляции r 0,33); и высокий уровень связи – при количественном определении верапамила в крови методом ГХ-МС (коэффициент корреляции r 0,98).

4. Сравнение средних значений содержания анализируемого вещества для разных аналитических методик не является достаточным тестом для проверки наличия систематической погрешности. Целесообразно применять алгоритм, предполагающий последовательный статистический анализ относительной и систематической ошибок среднего значения содержания анализируемого вещества, а также исследование их корреляционной зависимости.

5. Предложен алгоритм оценки погрешности этапа пробоподготовки с применением компьютерной программы «ChemMetr Evaluation 1.0» и уравнения Горвица для методик количественного определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в крови. Сравнительный статистический анализ данного алгоритма с алгоритмом, основанным на применении уравнения Горвица, показал его «гибкость», связанную с учетом предельных погрешностей каждого этапа аналитической методики.

6. Разработан алгоритм планирования и оптимизации пробоподготовки, основанный на многофакторном планировании эксперимента по схеме Бокса-Бенкена, на примерах определения диосмина в лекарственных препаратах и верапамила в крови. Данный алгоритм имеет универсальный характер и может применяться для оптимизации процедуры анализа в контроле качества других лекарственных средств и судебно-медицинской экспертизе.

7. Разработана компьютерная программа для ЭВМ «ChemPlan 1.0», которая автоматически формирует матрицу по планированию и оптимизации пробоподготовки, исходя из перечня и уровня факторов, влияющих на эффективность экстракции.

8. Получены математические модели твердо-жидкостной экстракции диосмина из лекарственных препаратов и жидкость-жидкостной экстракции верапамила из проб крови, имеющие форму уравнений множественной линейной регрессии. Данные уравнения позволяют определять наиболее значимые факторы, влияющие на степень извлечения анализируемых веществ, и являются основой для визуализации результатов статистического анализа.

9. Разработанный алгоритм планирования и оптимизации пробоподготовки апробирован и внедрен в работу отделов контроля качества фармацевтических предприятий ООО «Самарская фармацевтическая фабрика» и ООО «Лекарь», судебно-химического отделения Филиала №3 ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России, а также внедрен в учебный процесс в Пермской государственной фармацевтической академии, в Башкирском государственном медицинском университете и Курском государственном медицинском университете.

Практические рекомендации

Данные, полученные в ходе диссертационного исследования, имеют практическую значимость в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе.

Рекомендуется:

- использовать разработанные алгоритмы для оценки погрешности аналитических методик и их отдельных этапов в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе;

- использовать компьютерную программу для ЭВМ «ChemPlan 1.0» для научно обоснованной разработки методик количественного анализа в научно-исследовательской работе и рутинной аналитической практике.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в разработке комплекса мероприятий и нормативных документов по метрологической оценке и

оптимизации методик количественного анализа в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-селективным детектированием

ТСХ-КД – тонкослойная хроматография с компьютерной денситометрией

СИ – степень извлечения

СО – стандартный образец

ФСО – фармакопейный стандартный образец

ВСО – вторичный стандартный образец

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автоматизация и миниатюризация химического анализа на принципах проточных методов (обзор) / А. В. Булатов, А. Л. Москвин, Л. Н. Москвин [и др.] // Научное приборостроение. – 2015. – Т. 25, № 2. – С. 3–26.
2. Айсуева, Т. С. Оценка влияния предварительной обработки проб на точность аналитических данных / Т. С. Айсуева, Т. Н. Гуничева // Аналитика и контроль. – 2000. – Т. 4, № 2. – С. 191–197.
3. Акатьева, Т. Г. Использование метода вариационной статистики в экотоксикологии / Т. Г. Акатьева // Актуальные проблемы экологии и природопользования : сборник статей по материалам III Всероссийской (национальной) научно-практической конф. (Курган, 10 апреля 2019 года) / под общей ред. С. Ф. Сухановой. – Курган : Курганская государственная сельскохозяйственная академия им. Т. С. Мальцева, 2019. – С. 179–183.
4. Анацкая, А. С. Химико-токсикологический анализ алимемазина в биологических жидкостях при остром отравлении : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Анацкая Анна Сергеевна. – Пятигорск, 2021. – 135 с.
5. Арзамасцев, А. П. Валидация аналитических методов / А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, Ю. Я. Харитонов // Фармация. – 2006. – № 4. – С. 8–12.
6. Архангельская, Е. А. Соответствие положений стандартов ГОСТ р ИСО 5725 при оценке точности результатов измерений / Е. А. Архангельская, Э. Л. Заморенова // Аналитика и контроль. – 2017. – Т. 21, № 4. – С. 322–331.
7. Ахназарова, С. Л. Методы оптимизации эксперимента в химической технологии : учебное пособие для хим.-технол. спец. вузов / С. Л. Ахназарова, В. В. Кафаров. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : Высшая школа, 1985. – 327 с.
8. Барановская, В. Б. Актуальные проблемы качества химического анализа / В. Б. Барановская, М. Ю. Медведевских, Ю. А. Карпов // Аналитика и контроль. – 2021. – Т. 25, № 4. – С. 273–279.

9. Барановская, В. Б. Валидация методик химического анализа: международные требования / В. Б. Барановская, М. Ю. Медведевских // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2018. – Т. 84, № 12. – С. 25–31.
10. Баратова, Н. С. Глобальное распространение стандартных образцов. Обзор / Н. С. Баратова, Е. В. Осинцева, О. Н. Кремлева // Стандартные образцы. – 2014. – № 4. – С. 36–43.
11. Барсукова, Ю. Н. Разработка и валидация методики спектрофотометрического определения кислоты аминапроновой в многокомпонентном гемостатическом средстве / Ю. Н. Барсукова, О. А. Мельникова, М. Ю. Мельников // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – № 1(22). – С. 76–83.
12. Бессонов, Ю. С. Применение международных стандартов при аналитическом контроле / Ю. С. Бессонов, А. С. Степанов // Методы оценки соответствия. – 2010. – № 5. – С. 39–40.
13. Булгакова, Е. А. Определение биологически активного соединения кон-1 в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с минимальной пробоподготовкой: разработка и валидация методики, использование в доклинических фармакокинетических исследованиях / Е. А. Булгакова, Ю. Н. Карпенко // Сеченовский вестник. – 2018. – № 1(31). – С. 60–65.
14. Валидация аналитических методик : перевод с английского языка 2-го издания под редакцией Г. Р. Нежиховского. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях : перевод с английского языка 3-го издания под редакцией Р. Л. Кадиса : [к сборнику в целом] : руководство для лабораторий / Eurachem. – Санкт–Петербург : Профессия, 2016. – 309 с. : ил.
15. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / под ред. В. В. Береговых. – Москва : Литтера, 2008. – 132 с.
16. Вергун, О. М. Оптимизация методик пробоподготовки для идентификации и количественного определения клозапина в биологическом материале / О. М. Вергун, А. В. Лишай, Д. Д. Гриншпан // БГМУ в авангарде

медицинской науки и практики: рецензируемый ежегодный сборник научных трудов / Министерство здравоохранения Республики Беларусь ; Белорусский государственный медицинский университет. – Минск : Белорусский государственный медицинский университет, 2021. – С. 529–534.

17. Веремчук, О. А. Валидация методики количественного определения флавоноидов в побегах вереска обыкновенного / О. А. Веремчук, Д. В. Моисеев // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 128–135.

18. Верификация методики количественного определения эфирного масла в траве Зизифоры Бунге / К. А. Жапаркулова, З. Б. Сакипова, Л. Н. Ибрагимова [и др.] // Здравоохранение Таджикистана. – 2016. – № 1(328). – С. 32–38.

19. Вис, Д. И. Верификация и контроль качества рутинных гематологических анализаторов / Д. И. Вис, А. Хьюсман // Лабораторная служба. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 30–39.

20. Возможности использования метода ядерного магнитного резонанса при аттестации стандартных образцов / Н. Е. Кузьмина, С. В. Моисеев, В. А. Яшкир [и др.] // Стандартные образцы. – 2014. – № 2. – С. 19–25.

21. Волкова, А. А. Разработка лабораторной информационной системы контроля и управления качеством производства карбамидоформальдегидных смол / А. А. Волкова, П. Г. Михайлова // Успехи в химии и химической технологии. – 2015. – Т. 29, № 4(163). – С. 36–38.

22. Волынский, А. Б. Аналитическая химия и метрология: актуальные вопросы взаимодействия / А. Б. Волынский // Лаборатория и производство. – 2019. – № 5(9). – С. 66–71.

23. Волынский, А. Б. Химические модификаторы в современной электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии / А. Б. Волынский // Журнал аналитической химии. – 2003. – Т. 58, № 10. – С. 1015–1033.

24. Воронин, А. В. Денситометрическое определение некоторых лекарственных веществ в крови / А. В. Воронин // Медицинский вестник Башкортостана. – 2018. – Т. 13, № 2(74). – С. 40–43.

25. Воронин, А. В. Методология исследования отдельных многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе / А. В. Воронин, Т. Л. Малкова ; Самарский государственный медицинский университет. – Самара : Инсома-пресс, 2020. – 328 с.
26. Воронин, А. В. Метрологические характеристики методики количественного определения диосмина в лекарственных препаратах / А. В. Воронин, М. Н. Качалкин, А. В. Карпов // Аспирантский вестник Поволжья. – 2020. – № 5–6. – С. 151–156.
27. Воронин, А. В. Различные методы количественного определения верапамила в крови / А. В. Воронин // Аспирантский вестник Поволжья. – 2019. – № 5–6. – С. 116–121.
28. Воронин, А. В. Разработка алгоритма метрологической оценки методик количественного анализа многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе / А. В. Воронин, Т. Л. Малкова, Т. В. Воронина // Наука и инновации - современные концепции : сборник научных статей по итогам работы Международного научного форума (Москва, 26 июля 2019 года) / ответственный ред. Д. Р. Хисматуллин. – Москва : Инфинити, 2019. – Т. 1. – С. 109–115.
29. Воронин, А. В. Разработка методологических основ исследования отдельных многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Воронин Александр Васильевич. – Самара, 2019. – 392 с.
30. Гармаш, А. В. Метрологические основы аналитической химии / А. В. Гармаш, Н. М. Сорокина. – 4-е изд., испр. и доп. – Москва : МГУ им. МВ Ломоносова, 2012. – 51 с.

31. Горбачева, Т. В. Альтернативные объекты судебно-химических исследований / Т. В. Горбачева, В. А. Бычков // Судебная медицина. – 2019. – Т. 5, № S1. – С. 123–124.
32. Горелов, П. Автоматизация пробоподготовки для лабораторных исследований / П. Горелов, П. Ляхов // Аналитика. – 2015. – № 1(20). – С. 74–81.
33. Горюнова, С. М. Оптимизация системы метрологического обеспечения лаборатории по оценке качества проводимых измерений / С. М. Горюнова, Р. Н. Исмаилова, И. Г. Фаттахов // Вестник Технологического университета. – 2017. – Т. 20, № 8. – С. 120–123.
34. ГОСТ 24297-2013 Верификация закупленной продукции. Организация проведения и методы контроля : межгосударственный стандарт : издание официальное : принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 7 июня 2013г. № 43) / разработан ОАО «ВНИИС». – Москва : Стандартинформ, 2019. – 16 с.
35. ГОСТ 8.315-2019 Государственная система обеспечения единства измерений Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов Основные положения : межгосударственный стандарт : издание официальное : принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 октября 2019 г. № 123–П) / разработан ФГУП «УНИИМ». – Москва : Стандартинформ, 2019. – 39 с.
36. ГОСТ ISO Guide 34-2014 Общие требования к компетентности изготовителей стандартных образцов : межгосударственный стандарт : издание официальное : принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 июня 2019 г. № 55) / подготовлен Республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный центр аккредитации». – Москва : Стандартинформ, 2015. – 40 с.
37. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий : межгосударственный стандарт : издание официальное : принят Межгосударственным советом по стандартизации,

метрологии и сертификации (протокол от 14 ноября 2014 г. № 72–П) / подготовлен ФГУП «УНИИМ». – Москва : Стандартиформ, 2021. – 32 с.

38. ГОСТ Р 58972-2020 Оценка соответствия Общие правила отбора образцов для испытаний продукции при подтверждении соответствия : национальный стандарт РФ : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 августа 2020 г. № 562–ст / разработан ФГУП «Российский научно–технический центр информации по стандартизации, метрологии и оценке соответствия», ООО «Агентство независимых экспертиз в сфере технического регулирования». – Москва : Стандартиформ, 2020. – 15 с.

39. ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений методики (методы) измерений : национальный стандарт РФ : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 декабря 2009 г. № 1253–ст / разработан ФГУП «ВНИИМС». – Москва : Стандартиформ, 2010. – 33 с.

40. ГОСТ Р 8.736-2011 Государственная система обеспечения единства измерений Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов измерений. Основные положения : национальный стандарт РФ : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 1045–ст / разработан ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева». – Москва : Стандартиформ, 2019. – 21 с.

41. ГОСТ Р ИСО 21748-2012 Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений : национальный стандарт РФ : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1419–ст / подготовлен АНО «НИЦ КД». – Москва : Стандартиформ, 2014. – 39 с.

42. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений : государственный стандарт РФ : издание

официальное : принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 23 апреля 2022 г. № 161–ст / разработан ГР «ВНИИМС», ВНИИСтандарт, ВНИИКИ Госстандарта России. – Москва : Стандартиформ, 2009. – 32 с.

43. ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий измерений : национальный стандарт РФ : издание официальное : принят и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2006 г. № 506–ст / подготовлен ААЦ «Аналитика», ВНИИС. – Москва : Стандартиформ, 2007. – 32 с.

44. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание : Федеральная электронная медицинская библиотека : [сайт]. – 2018 – . – URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения: 19.12.2022). – Текст : электронный.

45. Гржибовский, А. М. Корреляционный и однофакторный линейный регрессионный анализ с использованием программного обеспечения SPSS и СТАТА / А. М. Гржибовский, Т. Н. Унгурияну, М. А. Горбатова // Наркология. – 2017. – Т. 16, № 9(189). – С. 52–69.

46. Дворкин, В. И. Метрология и обеспечение качества химического анализа / В. И. Дворкин. – 2-е изд., испр. и доп. – Москва : Рекламно-издательский центр «Техносфера», 2019. – 318 с.

47. Дворская, О. Н. Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях с использованием твердофазной экстракции : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Дворская Оксана Николаевна. – Пермь, 2019. – 373 с.

48. Дегтерев, Е. В. Анализ лекарственных средств в исследованиях, производстве и контроле качества / Е. В. Дегтерев // Российский Химический Журнал. – 2002. – Т. 46, № 4. – С. 43–51.

49. Евдокимова, О. В. Оптимизация определения рения в медном и молибденовом рудном сырье методом атомноэмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой : специальность 02.00.02 «Аналитическая химия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук / Евдокимова Ольга Викторовна. – Екатеринбург, 2013. – 24 с.

50. Егоров, А. Ф. Учебно-исследовательская лабораторная информационная система контроля и управления качеством продукции отделения первичной переработки нефти / А. Ф. Егоров, П. Г. Михайлова, М. Х. До // Нефтепереработка и нефтехимия. Научно-технические достижения и передовой опыт. – 2013. – № 7. – С. 10–14.

51. Илларионова, Е. А. Совершенствование спектрофотометрического и хроматографического методов анализа азотсодержащих лекарственных средств : специальность 15.00.02 «Фармацевтическая химия» : диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук / Илларионова Елена Анатольевна. – Москва, 2004. – 379 с.

52. Илларионова, Е. А. Судебно-химическое отделение Бюро судебно-медицинской экспертизы : учебное пособие / Е. А. Илларионова, И. П. Сыроватский ; ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, Кафедра фармацевтической и токсикологической химии. – Иркутск : ИГМУ, 2020. – 50 с.

53. Кадис, Р. Л. Метрологический и статистический смысл понятия «точность» в химическом анализе. ИСО 5725, показатели точности и неопределенность измерений / Р. Л. Кадис // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2006. – Т. 72, № 2. – С. 53–60.

54. Кадис, Р. Л. Неопределенность измерений и химический анализ / Р. Л. Кадис // Журнал аналитической химии. – 2008. – Т. 63, № 1. – С. 104–110.

55. Калачева, О. А. Требования к лабораториям, осуществляющим аналитическое исследование отходов / О. А. Калачева // Транспорт: наука, образование, производство (транспорт-2021). труды Международной научно-практической конф. (Воронеж, 19–21 апреля 2021 года). – Воронеж : Филиал

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный университет путей сообщения». – Воронеж, 2021. – С. 93–96.

56. Карпов, Ю. А. Проблемы стандартизации методов химического анализа в металлургии / Ю. А. Карпов, В. Б. Барановская // Применение анализаторов МАЭС в промышленности. Материалы XVI Международного симпозиума, Академгородок (Новосибирск, 14–16 августа 2018 года). – Академгородок, Новосибирск : Сибирское отделение Российской академии наук, 2018. – С. 6.

57. Карпов, Ю. А. Решенные и нерешенные проблемы метрологии химического анализа / Ю. А. Карпов, М. Н. Филиппов, В. Б. Барановская // Журнал аналитической химии. – 2019. – Т. 74, № 9. – С. 643–651.

58. Квачахия, Л. Л. Идентификация и количественное определение верапамила в биологическом материале / Л. Л. Квачахия // Региональный вестник. – 2017. – № 4(9). – С. 17–18.

59. Квачахия, Л. Л. Разработка методологии судебно-химического анализа лекарственных веществ из группы блокаторов кальциевых каналов : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Квачахия Лексо Лорикович. – Москва, 2021. – 440 с.

60. Козлов, А. В. Разработка методики количественного анализа дабигатрана для задач фармакокинетики и лекарственного мониторинга : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Козлов Алексей Владимирович. – Москва, 2020. – 23 с.

61. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК CG 4 / ред. S. L. R. Ellison, A. Williams. – 3-е изд., перевод с англ. яз. – URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1_RU.pdf (дата обращения: 23.12.2022). – Текст : электронный.

62. Количественное определение содержания арипипразола, рисперидона и их активных метаболитов в плазме крови человека посредством жидкостной tandemной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС/МС) / Н. В. Баймеева, Е. В. Бондаренко, С. С. Потанин [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – № 3(8). – С. 170–175.

63. Крашановская, Т. Р. Специфика проведения химико-токсикологического анализа в условиях оказания экстренной помощи / Т. Р. Крашановская, А. К. Калдыбаева, Ж. А. Исина // Актуальные проблемы современности. – 2016. – № 4(14). – С. 202–206.

64. Крылов, А. И. Контроль органических компонентов. Обеспечение прослеживаемости результатов измерений / А. И. Крылов, А. Ю. Михеева, И. Ю. Ткаченко // Контроль качества продукции. – 2017. – № 11. – С. 12–17.

65. Кускова, И. С. Оптимизация условий проведения элементного анализа биологических объектов методами дуговой и пламенной атомноэмиссионной спектрометрии : специальность 02.00.02 «Аналитическая химия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Кускова Ирина Сергеевна. – Томск, 2017. – 116 с.

66. Леонтьев, Д. А. Система вторичных стандартных образцов в лабораториях контроля качества лекарственных средств / Д. А. Леонтьев // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2016. – № 1. – С. 50–55.

67. Лещев, С. М. Константы распределения низших спиртов, ацетона и этилацетата в системах н-гексан-водные растворы неорганических солей и природа эффекта высаливания / С. М. Лещев, М. Ф. Заяц // Журнал физической химии. – 2012. – Т. 86, № 6. – С. 1072.

68. Лоханина, С. Ю. Метрологическое обеспечение качества количественного химического анализа : учебно-методическое пособие / С. Ю. Лоханина, С. П. Чернова. – Ижевск : Издательский дом «Удмуртский университет», 2022. – 54 с.

69. Малышева, А. О. Особенности валидации аналитических методик для определения качества радиофармацевтических препаратов / А. О. Малышева, Г. Е. Кодина, Е. А. Лямцева // Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии. Сб. тез. докладов Шестой Междисциплинарной конф. (Нижний Новгород, 27–30 сентября 2020 года) / под ред. К. В. Кудрявцева, Е. М. Паниной. – Москва : Издательство «Перо», 2020. – С. 181.

70. Марахова, А. И. Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Марахова Анна Игоревна. – Самара, 2017. – 22 с.

71. Мельников, Е. С. Химико-токсикологический анализ гипотензивных лекарственных средств при острых отравлениях : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Мельников Евгений Сергеевич. – Москва, 2016. – 112 с.

72. Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала. – Москва, 2014. – 76 с.

73. Монахова, Ю. Б. Методология хемометрического моделирования спектрометрических сигналов в анализе объектов сложного состава / Ю. Б. Монахова, С. П. Муштакова // Журнал аналитической химии. – 2017. – Т. 72, № 2. – С. 119–128.

74. Моногарова, О. В. Цветометрия в химическом анализе / О. В. Моногарова, К. В. Осколок, В. В. Апяри // Журнал аналитической химии. – 2018. – Т. 73, № 11. – С. 857–867.

75. Нежиховский, Г. Р. Валидация, верификация и аттестация методик / Г. Р. Нежиховский // Контроль качества продукции. – 2016. – № 9. – С. 17–21.

76. Никулин, А. В. Комбинированная методика определения элементного состава лекарственного растительного сырья / А. В. Никулин, Е. А. Платонов, О. Г. Потанина // Фармация. – 2016. – Т. 65, № 2. – С. 22–25.
77. Определение селена, мышьяка и сурьмы в образцах растительного происхождения методом ААС-ЭТА / Н. Р. Низамутдинова, В. И. Сафарова, Р. М. Хатмуллина [и др.] // Башкирский химический журнал. – 2019. – Т. 26, № 1. – С. 48–53.
78. Оптимизация планирования эксперимента при обработке растительного сырья / И. В. Соболев, А. В. Казакевич, Л. В. Донченко [и др.] // Вестник КрасГАУ. – 2021. – № 6(171). – С. 176–184.
79. Осинцева, Е. В. Система метрологического прослеживаемости стандартных образцов в Российской Федерации / Е. В. Осинцева // II-я Международная научная конф. «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». Сб. тр. (Екатеринбург, 14–18 сентября 2015 года). – Екатеринбург : Уральский научно-исследовательский институт метрологии, 2015. – С. 38–42.
80. Осипов, К. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой в анализе биологических проб и фармацевтических препаратов / К. Осипов, И. Ф. Серегина, М. А. Большов // Успехи химии. – 2016. – Т. 85, № 4. – С. 335–355.
81. Охрименко, Л. П. Сравнительное исследование толокнянки, брусники и близких к ним видов, произрастающих в Республике Саха (Якутия) / Л. П. Охрименко, Г. И. Калинкина, С. Е. Дмитрук // Химия растительного сырья. – 2005. – № 1. – С. 31–35.
82. Павлова, Т. В. Оценка показателей качества методики определения влажности сыпучих веществ и материалов методом взвешивания / Т. В. Павлова, Н. И. Мовчан // Вестник Технологического университета. – 2015. – Т. 18, № 5. – С. 130–136.
83. Пендин, А. А. Поверхностные свойства водных растворов сильных электролитов и их высаливающее (всаливающее) действие / А. А. Пендин, П. К. Леонтьевская // Журнал физической химии. – 2000. – Т. 74, № 10. – С. 1792–1797.

84. Петров, А. Некоторые особенности применения стандартных образцов в фармации (обзор литературы) / А. Петров, Е. Сысуев, Н. Новикова // Сб. статей. II Международной научно-практической конф. молодых ученых «Роль технического регулирования и стандартизации в эпоху цифровой экономики». – Екатеринбург, 2020. – С. 21–32.
85. Петрова, М. О. Развитие исследований в аналитической лаборатории ВИЗР по оценке остаточных количеств пестицидов / М. О. Петрова, Т. Д. Черменская, В. И. Долженко // Вестник защиты растений. – 2020. – Т. 103, № 2. – С. 93–99.
86. Применение высаливания для извлечения гидрофильных физиологически активных веществ из водных растворов для их дальнейшего хроматографического определения / С. М. Лещев, О. Н. Михнюк, К. Д. Крыжный [и др.] // Аналитика и контроль. – 2019. – Т. 23, № 4. – С. 494–500.
87. Причард, Э. Контроль качества в аналитической химии / Э. Причард, В. Барвик ; пер. с англ. под ред. И. В. Болдырева. – Санкт–Петербург : Профессия, 2011. – 320 с.
88. Проблема единого подхода к аттестации стандартных образцов для контроля качества лекарственных средств / А. А. Жигалина, О. Ю. Стрелова, Н. И. Котова [и др.] // Фармация. – 2021. – Т. 70, № 8. – С. 5–11.
89. Прокофьев, Д. В. Количественный хроматографический анализ методом абсолютной градуировки с использованием дополнительного стандарта / Д. В. Прокофьев, И. Г. Зенкевич // Вестник Санкт–Петербургского университета. Физика и химия. – 2016. – Т. 3 (61), № 3. – С. 337–344.
90. Пронских, В. С. Проблемы измерений: современные дискуссии и модели / В. С. Пронских // Успехи физических наук. – 2020. – Т. 190, № 2. – С. 211–219.
91. Разработка государственного вторичного эталона и стандартных образцов состава на основе жидкостной и газовой хроматографии / О. С. Шохина, М. Ю. Медведевских, М. П. Крашенинина [и др.] // Стандартные образцы. – 2017. – Т. 13, № 1. – С. 9–26.

92. Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в таблетках / З. С. Шпрах, Е. В. Игнатьева, И. В. Ярцева [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 55–61.

93. Решетниова, В. Н. Хемометрика и оптимизация автоматизированного химического анализа с помощью искусственных нейронных сетей / В. Н. Решетникова, В. В. Кузнецов // Компьютерные науки и информационные технологии. Материалы Международной научной конф. (Саратов, 30 июня – 02 2016). – Саратов : ИЦ «Наука», 2016. – С. 336–338.

94. РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа : рекомендации по межгосударственной стандартизации : издание официальное : приняты межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 июня 2014 г. № 45) / разработаны ФГУП «УНИИМ». – Москва : Стандартинформ, 2016. – 114 с.

95. Родинков, О. В. Основы метрологии физико-химических измерений и химического анализа : учебно-методическое пособие / О. В. Родинков, Н. А. Бокач, А. В. Булатов. – Санкт–Петербург : ВВМ, 2010. – 136 с.

96. Руководство Eurachem «Пригодность аналитических методов для конкретного применения. Руководство для лабораторий по валидации методов и смежным вопросам» / под ред. Б. Магнуссона, У. Эрнемарка : перевод второго издания 2014 г. – Киев : Юрка Любченка, 2016. – 92 с.

97. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / под ред. С. Н. Быковского, И. А. Василенко, М. И. Харченко [и др.]. – Москва : Изд-во Перо, 2014. – 656 с.

98. Савельева, Е. И. Опыт применения газовой хроматомасс-спектрометрии в сочетании с твердофазной микроэкстракцией для исследования состава летучих органических соединений в матрицах с высоким содержанием жиров / Е. И. Савельева, Е. Д. Кессених, Л. К. Густылева // Аналитика и контроль. – 2020. – Т. 24, № 1. – С. 21–30.

99. Савкова, Е. Н. Систематизация подходов к причинно-следственному моделированию неопределенности при отборе проб и пробоподготовке / Е. Н. Савкова // Стандартизация. – 2019. – № 1. – С. 33–44.

100. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2022618582 от 12.05.2022. «ChemPlan 1.0»/ А.В. Воронин, А.В. Карпов, О.В. Баранов [Электронный ресурс]: Федеральный институт промышленной собственности. – Режим доступа: <https://www1.fips.ru/iiss/document.xhtml?facesredirect=true&id=773b42aae5118645cb095e7b7706868e>.

101. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2019617347 от 06.06.2019. «ChemMetr Evaluation 1.0» / А.В. Воронин, И.В. Сынбулатов, М.Н. Качалкин, С.В. Воронин [Электронный ресурс]: База патентов России. – Режим доступа: <https://patentinform.ru/programs/reg-2019617347.html>.

102. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2017663573 от 07.12.2017. «ChemMetr 1.0» / А.В. Воронин, С.В. Воронин, Т.Л. Малкова, М.Е. Ледяев [Электронный ресурс]: База патентов России. – Режим доступа: <https://patentinform.ru/programs/reg-2017663573.html>.

103. Севостьянова, Н. Т. Анализ методов оптимизации и планирования эксперимента в химии и химической технологии / Н. Т. Севостьянова, С. А. Баташев // Инновационное развитие науки и образования: монография. – Пенза : Наука и Просвещение (ИП Гуляев Г. Ю.), 2018. – С. 115–122.

104. Селезнева, Е. В. Система автоматизированного планирования эксперимента и получения уравнения регрессии / Е. В. Селезнева, Т. А. Юрина // Вестник Сибирской государственной автомобильно-дорожной академии. – 2014. – № 3(37). – С. 84–87.

105. Смагунова, А. Н. Методы математической статистики в аналитической химии / А. Н. Смагунова, О. М. Карпукова ; Иркутский государственный университет. – Иркутск : Иркутский государственный университет, 2008. – 339 с.

106. Сорбционное концентрирование микрокомпонентов для целей химического анализа / Ю. А. Золотов, Г. И. Цизин, Е. И. Моросанова [и др.] // Успехи химии. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 41–66.

107. Сорокин, А. С. Планирование и статистическая обработка данных экспериментов в пакете r / А. С. Сорокин, Н. А. Моисеев, В. И. Митрофанов // Интеллект. Инновации. Инвестиции. – 2017. – № 1. – С. 58–64.

108. Стандартные образцы в практике зарубежного и отечественного фармацевтического анализа / А. Н. Миронов, И. В. Сакаева, Е. И. Саканян [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2012. – № 3. – С. 56–60.

109. Столяров, Е. Е. Разработка хроматографических методик и методического подхода к метрологическому обеспечению химико-токсикологического анализа местных анестетиков : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Столяров Евгений Евгеньевич. – Пермь, 2011. – 24 с.

110. Теодорссон, Э. Смещение в клинической химии / Э. Теодорссон, Б. Магнуссон, И. Лейто // Лабораторная служба. – 2018. – Т. 7, № 3–1. – С. 41–58.

111. Терещенко, А. Г. Внутрилабораторный контроль качества результатов химического анализа / А. Г. Терещенко, Н. П. Пикула. – 2-е изд., испр. и доп. – Томск : СТТ, 2022. – 266 с.

112. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов : учебное пособие для вузов / под ред. Н. И. Калетиной. – Москва : ГЭОТАР-медиа, 2007. – 1016 с.

113. Уменьшение случайной составляющей погрешности количественных газохроматографических определений способом внешнего стандарта за счет использования сигнала растворителя / И. Г. Зенкевич, С. В. Бывшева, А. И. Герасимов [и др.] // Аналитика и контроль. – 2022. – Т. 26, № 2. – С. 141–149.

114. Унгуряну, Т. Н. Однофакторный дисперсионный анализ с использованием пакета статистических программ STATA / Т. Н. Унгуряну, А. М. Гржибовский // Экология человека. – 2014. – № 5. – С. 60–64.

115. Фадеев, Д. А. Пробоподготовка и исследование дисульфирама методом ВЭЖХ / Д. А. Фадеев, П. Р. Шмидт, Т. А. Силкина // Актуальные вопросы судебной медицины и права : сборник научно-практических статей, посвященный 70-летию организации Республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы МЗ РТ. – Казань : Государственное автономное учреждение здравоохранения «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы министерства здравоохранения Республики Татарстан», 2020. – С. 222–226.

116. Федеральный закон № 102-ФЗ от 26.06.2008 «Об обеспечении единства измерений». – Текст: электронный // КонсультантПлюс [сайт]. – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_77904/ (дата обращения 19.12.2022)

117. Хажжар, Ф. Определение суммы тритерпеновых сапонинов в комбинированном лекарственном средстве на основе пустырника, синюхи голубой и боярышника методом спектрофотометрии / Ф. Хажжар, О. Г. Потанина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24, № 12. – С. 41–45.

118. Халафян, А. А. Статистический анализ данных. Statistica 6.0. : учебное пособие / А. А. Халафян. – Краснодар : КубГУ, 2005. – 307 с.

119. Черкасов, Д. Г. Высаливание масляной кислоты из водных растворов хлоридом калия / Д. Г. Черкасов, К. К. Ильин // Журнал прикладной химии. – 2009. – Т. 82, № 5. – С. 864–867.

120. Шавейко, А. И. Концепция разработки веб-приложения для автоматизированного планирования химических экспериментов / А. И. Шавейко, А. В. Олеферович // Молодежь и научно-технический прогресс : сборник докладов XIII Международной научно-практической конф. студентов, аспирантов и молодых ученых / Е. Н. Иванцова, В. М. Уваров [и др.]. – Белгород : Белгородский

государственный технологический университет им. В. Г. Шухова, 2020. – Т. 1. – С. 201–203.

121. Шорманов, В. К. Определение верапамила в биологическом материале / В. К. Шорманов, Л. Л. Квачахия // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2014. – № 24(195). – С. 226–230.

122. Эпштейн, Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) / Н. А. Эпштейн // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 40–56.

123. Ярошенко, Д. В. Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии : специальность 02.00.02 «Аналитическая химия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук / Ярошенко Дмитрий Вадимович. – Санкт-Петербург, 2014. – 23 с.

124. Яшин, Я. И. Аналитическая хроматография. Методы, аппаратура, применение / Я. И. Яшин, А. Я. Яшин // Успехи химии. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 366–379.

125. A Deep Eutectic Solvent as an Extraction Solvent to Separate and Preconcentrate Parabens in Water Samples Using in situ Liquid-Liquid Microextraction / D. Ge, Y. Wang, Q. Jianga [et al.]. – Text : electronic // J. Braz. Chem. Soc. – 2019. – Vol. 00, Issue 0. – P. 1–8. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/330731366> (date of access: 09.12.2022).

126. A surprising method for green extraction of essential oil from dry spices: Microwave dry-diffusion and gravity / A. Farhat, A. S. Fabiano-Tixier, F. Visinoni [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2010. – Nov. 19, vol. 1217(47). – P. 7345–7350.

127. Abdel-Ghany, M. F. Validation of four different spectrophotometric methods for simultaneous determination of Domperidone and Ranitidine in bulk and pharmaceutical formulation / M. F. Abdel-Ghany, O. Abdel-Aziz, Y. Y. Mohammed // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2015. – Vol. 149. – P. 30–40.

128. Ahuja, S. Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals / S. Ahuja, K. M. Alsante // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2003. – Vol. 5. – P. 430.
129. Alternative green extraction phases applied to microextraction techniques for organic compound determination / E. Carasek, G. Bernardi, S. N. Do Carmo [et al.]. – Text : electronic // Separations. – 2019. – Vol. 6, N 3. – 35. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/334495219> (date of access: 09.12.2022).
130. Aly, A. A. Green approaches to sample preparation based on extraction techniques / A. A. Aly, T. Górecki. – Text : electronic // Molecules. – 2020. – Vol. 25, N. 7. – 1719. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32283595/> (date of access: 09.12.2022).
131. Ameer, K. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review / K. Ameer, H. M. Shahbaz, J.-H. Kwon // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2017. – Vol. 16, N 2. – P. 295–315.
132. Analytical Chemistry: Tasks, Resolutions and Future Standpoints of the Quantitative Analyses of Environmental Complex Sample Matrices / E. Rosato, G. M. Merone, M. Locatelli [et al.] // Analytica. – 2022. – Vol. 3, Issue 3. – P. 312–324.
133. Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of amphetamine-type stimulants in blood and urine / M. K. Woźniak, M. Wiergowski, J. Aszyk [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – Vol. 148. – P. 58–64.
134. Application of green-extraction technique to evaluate of antioxidative capacity of wild population of fireweed (*Epilobium angustifolium*) / A. Nowak, A. Klimowicz, W. Duchnik [et al.]. – Text : electronic // Herba Polonica. – 2019. – Vol. 65, N 4. – P. 18–30. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/340392058> (date of access: 09.12.2022).
135. Application of ultrasound for green extraction of proteins from spirulina. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects / L. Vernès, M. Abert-Vian, M. El Maâtaoui [et al.] // Ultrasonics Sonochemistry. – 2019. – Vol. 54. – P. 48–60.

136. Ayman, H. K. MIP-Based Biomimetic Sensors for Static and Hydrodynamic Potentiometric Transduction of Sitagliptin in Biological Fluids / H. K. Ayman, R. G. Hoda // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2014. – Vol. 9. – P. 4361–4373.
137. Cádiz-Gurrea, M. L. Enhancing the yield of bioactive compounds from *Sclerocarya birrea* bark by green extraction approaches / M. L. Cádiz-Gurrea, J. Lozano-Sánchez, Á Fernández-Ochoa [et al.]. – Text : electronic // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, N 5. – 966. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30857290/> (date of access: 09.12.2022).
138. Characterization and in vitro cytotoxicity of phytochemicals from *Aspilia africana* obtained using green extraction techniques / I. Niyonizigiye, D. Nkurunziza, D. Ngabire [et al.] // *South African Journal of Botany*. – 2020. – Vol. 128. – P. 231–238.
139. Comparison of different green-extraction techniques and determination of the phytochemical profile and antioxidant activity of *Echinacea angustifolia* L. extracts / D. Russo, I. Faraone, F. Labanca [et al.] // *Phytochemical Analysis*. – 2019. – Vol. 30, N 5. – P. 547–555.
140. Corrêa, J. C. R. A platform for designing quantitative infrared spectrophotometric method for drugs and pharmaceuticals analysis: a rediscover for an ecological and safer technique in the routine quality control laboratories / J. C. R. Corrêa, H. R. N. Salgado // *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2014. – Vol. 3, N 6. – P. 2056–2059.
141. Development and validation of a sensitive method for alkyl sulfonate genotoxic impurities determination in drug substances using gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry / Z. Liu, H. Fan, Y. Zhou [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2019. – May 10, vol. 168. – P. 23–29.
142. Development and validation of a simple UV spectrophotometric method for the determination of levofloxacin both in bulk and marketed dosage formulations / M. Maleque, M. R. Hasan, F. Hossen [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2012. – Vol. 2(6). – P. 454–457.
143. Development and Validation of Four Spectrophotometric Methods for Assay of Rebamipide and its Impurity: Application to Tablet Dosage Form / M. A. Alqarni, R.

S. Moatamed, I. A. Naguib [et al.] // Journal of AOAC International. – 2022. – Vol. 105, Issue 1. – P. 299–308.

144. Development and Validation of Spectrophotometric Methods for the Estimation of Mesalamine in Tablet Dosage Forms / K. M. Patel, C. N. Patel, B. Panigrahi [et al.] // Journal of Young Pharmacists. – 2010. – Vol. 2(3). – P. 284–288.

145. Development and Validation of UV Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Hesperidin and Diosmin in the Pharmaceutical Dosage Form / D. Srilatha, M. Nasare, B. Nagasandhya [et al.]. – Text : electronic // ISRN Spectroscopy. – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 534830. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/534830/> (date of access: 09.12.2022).

146. Development, validation and comparison of two microextraction techniques for the rapid and sensitive determination of pregabalin in urine and pharmaceutical formulations after ethyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometric analysis / M. K. R. Mudiam, A. Chauhan, R. Ch. R. Jain [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2012. – Vol. 70. – P. 310–319.

147. Dwamena, A. K. Recent Advances in Hydrophobic Deep Eutectic Solvents for Extraction / A. K. Dwamena. – Text : electronic // Separations. – 2019. – Vol. 6, N 1. – 9. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/331067301> (date of access: 09.12.2022).

148. El-Yazbi, A. F. Comparative Validation of the Determination of Sofosbuvir in Pharmaceuticals by Several Inexpensive Ecofriendly Chromatographic, Electrophoretic, and Spectrophotometric Methods / A. F. El-Yazbi // Journal of AOAC International. – 2017. – Vol. 100, Issue 4. – P. 1000–1007.

149. Exploring the potential of microwaves and ultrasounds in the green extraction of bioactive compounds from *Humulus lupulus* for the food and pharmaceutical industry / K. Carbone, V. Macchioni, G. Petrella [et al.]. – Text : electronic // Industrial Crops and Products. – 2020. – Vol. 156. – 112888. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/343949551> (date of access: 09.12.2022).

150. Filippou, O. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis / O. Filippou, D. Bitas, V. Samanidou // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2017. – Vol. 1043. – P. 44–62.
151. Fiorentino, F. A. M. Development and validation of a UV-spectrophotometric method for determination of flucloxacillin sodium in capsules / F. A. M. Fiorentino, H. Salgado // *Current Pharmaceutical Analysis.* – 2012. – Vol. 8, N 1. – P. 101–106.
152. Fonner, D. E. Mathematical Optimization Techniques in Drug Product Design and Process Analysis / D. E. Fonner, J. R. Buck, G. S. Banker // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 1970. – Vol. 59, N 11. – P. 1587–1596.
153. Green extraction methods and environmental applications of carotenoids-a review / A. Singh, S. Ahmad, A. Ahmad // *RSC Advances.* – 2015. – Vol. 5(77). – P. 62358–62393.
154. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents / M. Cvjetko Bubalo, N. Ćurko, M. Tomašević [et al.] // *Food Chemistry.* – 2016. – Vol. 200. – P. 159–166.
155. Green Extraction Techniques as Advanced Sample Preparation Approaches in Biological, Food, and Environmental Matrices: A Review / J. S. Câmara, R. Perestrelo, C. V. Berenguer [et al.]. – Text : electronic // *Molecules.* – 2022. – Vol. 27, N 9. – 2953. – URL: <https://doi.org/10.3390/molecules27092953> (date of access: 09.12.2022).
156. Green extraction techniques for obtaining bioactive compounds from mandarin peel (*Citrus unshiu* var. Kuno): Phytochemical analysis and process optimization / S. Šafranko, I. Ćorković, I. Jerković. – Text : electronic // *Foods.* – 2021. – Vol. 10, N 5. – P. 1043. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34064619/> (date of access: 09.12.2022).
157. Green extraction techniques in green analytical chemistry / S. Armenta, S. Garrigues, F. A. Esteve-Turrillas [et al.] // *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* – 2019. – Vol. 116. – P. 248–253.
158. Green extraction techniques: Effect of extraction method on lipid contents of three medicinal plants of Apiaceae / K. Shams, N. Abdel-Azim, W. A. Tawfik [et al.]

// Journal of chemical and pharmaceutical research. – 2015. – Vol. 7, N 4. – P. 1080–1088.

159. Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental / B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind [et al.]. – Nordic Innovation, 2012. – 56 p.

160. Hansen solubility parameters for selection of green extraction solvents / A. Sánchez-Camargo, M. Bueno, F. Parada-Alfonso [et al.] // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2019. – Vol. 118. – P. 227–237.

161. Hansen, F. Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry / F. Hansen, E. L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard. – Text : electronic // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2020. – Sep. 10, vol. 189. – Article ID 113446. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32619730/> (date of access: 09.12.2022).

162. Ibanez, E. Green extraction techniques: principles, advances and applications / E. Ibanez, A. Cifuentes. – Text : electronic // Comprehensive Analytical Chemistry. – 2017. – Vol. 76. – URL: <https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1108068799> (date of access: 09.12.2022).

163. ISO Guide 30:1992. Terms and definitions used in connection with reference materials. – Text : electronic // ISO, Geneva. – 1992. – P. 1–24. – URL: <https://www.iso.org/standard/21638.html> (date of access: 09.12.2022).

164. Kaynaker, M. Determination of Tetracyclines in Milk, Eggs and Honey Using in-situ Ionic Liquid Based Dispersive Liquid–Liquid Microextraction / M. Kaynaker, M. Antep, M. Merdivan // Journal of Analytical Chemistry. – 2018. – Vol. 73, N 1. – P. 23–29.

165. Koška, I. Simple, fast and reliable CE method for simultaneous determination of ciprofloxacin and ofloxacin in human urine / I. Koška, K. Purgat, P. Kubalczyk. – Text : electronic // Scientific Reports. – 2022. – May 11, vol. 12(1). – Article ID 7729. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35545693/> (date of access: 09.12.2022).

166. Lisinger, T. P. J. Limitations of the Application of the Horwitz Equation / T. P. J. Lisinger, R. D. Josephs // Trends in Analytical Chemistry. – 2006. – Vol. 25, N 11. – P. 1125–1130.
167. Lu, W. Recent Application of Deep Eutectic Solvents as Green Solvent in Dispersive Liquid–Liquid Microextraction of Trace Level Chemical Contaminants in Food and Water / W. Lu, S. Liu, Z. Wu // Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 2022. – Vol. 52, Issue 3. – P. 504–518.
168. Makoś–Chelstowska, P. Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—a review / P. Makoś–Chelstowska, E. Słupek, J. Gębicki. – Text : electronic // Microchemical Journal. – 2020. – Vol. 152. – Article ID 104384. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/336977254> (date of access: 09.12.2022).
169. Mendez, A. S. Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form / A. S. Mendez, M. Steppe, E. E. Schapoval // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2003. – Vol. 33(5). – P. 947–954.
170. New Advanced Materials and Sorbent-Based Microextraction Techniques as Strategies in Sample Preparation to Improve the Determination of Natural Toxins in Food Samples / N. Casado, J. Ganán, S. Morante-Zarcero [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25, N 3. – P. 702.
171. Obtaining mathematical models for assessing efficiency of dust collectors using integrated system of analysis and data management STATISTICA Design of Experiments / A. V. Azarov, N. S. Zhukov, E. Yu. Kozlovtsseva [et al.] // Journal of Physics Conference Series. – 2018. – Vol. 1015, Issue 3. – P. 032010.
172. Optimization of a methodology for simultaneous determination of twelve chlorophenols in environmental water samples using in situ derivatization and continuous sample drop flow microextraction combined with gas chromatography-electron-capture detection / M. Karimaei, K. Sharafi, M. Moradi [et al.] // Analytical Methods. – 2017. – Vol. 9, Issue 19. – P. 2865–2872.

173. Optimization of Liquid Polyphenol Extraction from Coffee Pulp / F. Correa-Mahecha, W. Murillo, J. E. Arturo-Calvache [et al.] // *Chemical Engineering Transactions*. – 2022. – Vol. 93. – P. 307–312.
174. Overview of Different Modes and Applications of Liquid Phase-Based Microextraction Techniques / J. S. Câmara, R. Perestrelo, B. Olayanju [et al.]. – Text : electronic // *Processes*. – 2022. – Vol. 10, Issue 7. – Article ID 1347. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/361965137> (date of access: 09.12.2022).
175. Panja, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials / P. Panja // *Current Opinion in Food Science*. – 2018. – Vol. 23. – P. 173–182.
176. Parys, W. Significance of Chromatographic Techniques in Pharmaceutical Analysis / W. Parys, M. Dołowy, A. Pyka-Pająk. – Text : electronic // *Processes*. – 2022. – Vol. 10, N 1. – P. 172. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/357902089> (date of access: 09.12.2022).
177. Rapid determination of anti-estrogens by gas chromatography/mass spectrometry in urine: Method validation and application to real samples / E. Gerace, A. Salomone, G. Abbadessa [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2012. – Vol. 2(1). – P. 1–11.
178. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques / J. Soares da Silva Burato, D. A. Vargas Medina, A. L. de Toffoli [et al.] // *Journal of Separation Science*. – 2020. – Vol. 43, N 1. – P. 202–225.
179. Recovery of phenolic compounds of food concern from *Arthrospira platensis* by green extraction techniques / M. F. Da Silva, A. A. Casazza, P. F. Ferrari [et al.] // *Algal Research*. – 2017. – Vol. 25. – P. 391–401.
180. Singh, D. kumar. Development and validation of spectrophotometric methods for carbapenems in pharmaceutical dosage forms / D. kumar Singh, G. Maheshwari // *Medicinal Chemistry Research*. – 2013. – Vol. 22(12). – P. 5680–5684.
181. Uçaktürk, E. Development of sensitive and specific analysis of vildagliptin in pharmaceutical formulation by gas chromatography-mass spectrometry / E. Uçaktürk. – Text : electronic // *Journal of analytical methods in chemistry*. – 2015. – Vol. 2015. –

707414. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26682085/> (date of access: 09.12.2022).

182. Validation a solid-phase extraction-HPLC method for determining the migration behaviour of five aromatic amines from packaging bags into seafood simulants / X. K. OuYang, Y. Y. Luo, Y. G. Wang [et al.] // Food Additives & Contaminants: Part A. – 2014. – Vol. 31, Issue 9. – P. 1598–1604.

183. Vikas, K. Development, validation and stability study of UV spectrophotometric method for determination of daclatasvirin bulk and pharmaceutical dosage forms / K. Vikas, G. Sachin, B. Omprakash // Int. J. ChemTech Res. – 2017. – Vol. 10. – P. 281–287.

184. Yan, H. Recent development and applications of dispersive liquid–liquid microextraction / H. Yan, H. Wang // Journal of Chromatography A. – 2013. – Vol. 1295. – P. 1–15.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САМАРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ»**

Воронин А.В., Малкова Т.Л., Карпов А.В.

ПЛАНИРОВАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ЖИДКОСТЬ-ЖИДКОСТНОЙ ЭКСТРАКЦИИ В СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ

Информационное письмо

Москва
2022

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «Самарский
государственный медицинский
университет» Минздрава России,
д.м.н., профессор

 И.Л. Давыдкин
2022 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе и
инновационному развитию
ФГБОУ ВО «Курский
государственный медицинский
университет» Минздрава
России, д.м.н., профессор

 В.А. Липатов
2022 г.

АКТ № 39

о внедрении (использовании) результатов
научной и инновационной деятельности

Авторы внедрения: Карпов А.В., аспирант кафедры химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Воронин А.В., заведующий кафедрой химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89, (846)3321634.

Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования аспиранта Карпова А.В. «Разработка методических подходов метрологической оценки отдельных этапов анализа в контроле качества лекарственных средств и судебно-химической экспертизе».

Объект внедрения: Алгоритм планирования условий пробоподготовки крови методом жидкость-жидкостной экстракции при судебно-химических исследованиях с применением компьютерной программы для ЭВМ «ChemPlan 1.0».

Использовано: с 1 декабря 2022 года в учебном процессе и научной работе на кафедре фармацевтической, токсикологической и аналитической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курск, ул. Ямская, 18, (4712)581323.

Заключение: использование предложения позволяет обеспечить возможность разработки и оптимизации методик анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологическом материале.

Заведующий кафедрой фармацевтической, токсикологической
и аналитической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный
медицинский университет» Минздрава России,
доктор фармацевтических наук, доцент

 Л.Л. Квачахия

Ответственный за внедрение: аспирант кафедры химии ФГБОУ ВО
Самарский ГМУ Минздрава России

 А.В. Карпов

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО ПГФА
Минздрава России,

В.Г. Лужанин

«01» 12 2022 г.

Акт внедрения в учебный процесс

Наименование предложения: Алгоритм планирования условий пробоподготовки крови методом жидкость-жидкостной экстракции при судебно-химических исследованиях с применением компьютерной программы для ЭВМ «ChemPlan 1.0».

Кем предложено, адрес исполнителя: А.В. Карповым, аспирантом кафедры химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, А.В. Ворониным, заведующим кафедрой химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89, (846)3321634.

Место внедрения: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии, г. Пермь, ул. Крупской, 46, (342)2825864.

Результаты внедрения: положительные.

Эффективность внедрения: разработанный авторами алгоритм планирования условий пробоподготовки крови методом жидкость-жидкостной экстракции при судебно-химических исследованиях с применением компьютерной программы для ЭВМ «ChemPlan 1.0» используется в учебном процессе студентов по дисциплине «Токсикологическая химия». Алгоритм необходим для разработки и оптимизации аналитических методик лекарственных веществ и их метаболитов в биологическом материале.

Заведующий кафедрой токсикологической
химии, ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России
д.фарм.н., профессор



Т.Л. Малкова

«01» декабря 2022 г.

УТВЕРЖДАЮ

И.о. проректора по учебной работе
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

А.А. Цыглин

2022 г.

Акт внедрения в учебный процесс

Наименование предложения: использование программы для ЭВМ «ChemPlan 1.0» для математического планирования пробоподготовки в контроле качества лекарственных средств.

Кем предложено, адрес исполнителя: А.В. Карповым, аспирантом кафедры химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, А.В. Ворониным, заведующим кафедрой химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89, (846)3321634.

Место внедрения: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармации ИДПО, г. Уфа, ул. Пушкина, 96/98, (347) 2726067.

Результаты внедрения: положительные.

Эффективность внедрения: Программа для ЭВМ «ChemPlan 1.0» осуществляет генерацию матрицы эксперимента в соответствии с планом многофакторного трехуровневого планирования эксперимента с применением плана Бокса-Бенкена. Разработанная авторами программа для ЭВМ «ChemPlan 1.0» для математического планирования пробоподготовки используется в учебном процессе ординаторов по специальности «Фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Заведующий кафедрой фармации ИДПО
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,
д.фарм.н., профессор

В.А. Катаев

«07» декабря 2022 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Самарская фармацевтическая
фабрика»

М.С. Глебов

« 09 » 2022 г.

Акт внедрения

Наименование предложения: Алгоритм планирования пробоподготовки в контроле качества лекарственных средств с использованием программы для ЭВМ «ChemPlan 1.0».

Кем предложено, адрес исполнителя: А.В. Карповым, очным аспирантом кафедры химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

Место внедрения: ООО «Самарская фармацевтическая фабрика», 446112, Самарская область, г. Чапаевск, ул. 1-ая Монтажная, д. 12а, офис 5.

Результаты внедрения: Разработанная автором компьютерная программа для ЭВМ «ChemPlan 1.0» позволяет формировать матрицу эксперимента (план эксперимента) при оптимизации методики анализа в зависимости от количества учитываемых факторов с их трехуровневой градацией (низкий, средний, высокий). Дальнейшая обработка полученных экспериментальных данных может осуществляется в стороннем статистическом программном обеспечении. Реализованный алгоритм с применением математического планирования при помощи программы «ChemPlan 1.0», моделирования экстракции целевого анализируемого соединения и статистической обработки экспериментальных данных имеет универсальный характер и может применяться для оптимизации процедуры анализа в контроле качества лекарственных средств. Преимуществами предложенного алгоритма являются экспрессность и упрощение этапа оптимизации аналитических методик.

Главный технолог
ООО «Самарская фармацевтическая фабрика»

Д.С. Зуев

« 24 » 09 2022 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ООО «Лекарь»
Д.Ю. Бобров

«27» 09 2022 г.

**Акт внедрения**

Наименование предложения: Алгоритм планирования пробоподготовки в контроле качества лекарственных средств с использованием программы для ЭВМ «ChemPlan 1.0».

Кем предложено, адрес исполнителя: А.В. Карповым, очным аспирантом кафедры химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

Место внедрения: ООО «Самарская фармацевтическая фабрика», 446112, Самарская область, г. Чапаевск, ул. 1-ая Монтажная, д. 126.

Результаты внедрения: Разработанная автором компьютерная программа для ЭВМ «ChemPlan 1.0» позволяет формировать матрицу эксперимента (план эксперимента) при оптимизации методики анализа в зависимости от количества учитываемых факторов с их трехуровневой градацией (низкий, средний, высокий). Дальнейшая обработка полученных экспериментальных данных может осуществляться в стороннем статистическом программном обеспечении. Реализованный алгоритм с применением математического планирования при помощи программы «ChemPlan 1.0», моделирования экстракции целевого анализируемого соединения и статистической обработки экспериментальных данных имеет универсальный характер и может применяться для оптимизации процедуры анализа в контроле качества лекарственных средств. Преимуществами предложенного алгоритма являются экспрессность и упрощение этапа оптимизации аналитических методик.

Главный технолог
ООО «Лекарь»

« 27 » 09 2022г.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2022618582

ChemPlan 1.0.

Правообладатель: **Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)**

Авторы: **Воронин Александр Васильевич (RU), Карпов Александр Вячеславович (RU), Баранов Олег Владимирович (RU)**

Заявка № 2022618101

Дата поступления 21 апреля 2022 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре программ для ЭВМ 12 мая 2022 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Примеры метрологической оценки методик количественного определения веществ в многокомпонентных объектах аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе

НАШИХ МЕТОДИК

Таблица 1 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Детралекс®» таблетки 1000 мг; аналитическая длина волны 370 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_x	Относительная ошибка $(\sigma_x/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,8492 г	0,0002 г	0,010
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 370 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 370 нм	-	3,80
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			5,08
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			8,04
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			6,23
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,49
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,38
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			7,72

Таблица 2 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Детралекс®» суспензия: 1000 мг/10 мл; аналитическая длина волны 268 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 10 мл	0,1г	1,0
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 268 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 268 нм	-	5,30
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			7,13
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			11,4
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			8,90
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,93
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			4,35
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			11,03

Таблица 3 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Детралекс®» суспензия: 1000 мг/10 мл; аналитическая длина волны 370 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 10 мл	0,1г	1,0
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 370 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 370 нм	-	3,80
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			5,18
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			8,38
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			6,59
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,93
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			4,35
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			7,87

Таблица 4 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Венарус®» таблетки 900 мг; аналитическая длина волны 268 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,3200 г	0,0002 г	0,015
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 268 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 268 нм	-	5,30
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			6,76
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			9,52
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			6,70
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,42
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,21
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			9,28

Таблица 5 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Венарус®» таблетки 900 мг; аналитическая длина волны 370 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,3200 г	0,0002 г	0,015
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 370 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 370 нм	-	3,80
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			5,47
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			8,34
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			6,30
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,42
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,21
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			8,07

Таблица 6 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Флебофа®» таблетки 600 мг; аналитическая длина волны 268 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,1481 г	0,0002 г	0,017
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 268 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 268 нм	-	5,30
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			7,63
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			12,48
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			9,88
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,39
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,13
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			12,31

Таблица 7 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Флебофа®» таблетки 600 мг; аналитическая длина волны 370 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,1481 г	0,0002 г	0,017
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 370 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 370 нм	-	3,80
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			5,98
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			8,35
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			5,83
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,39
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,13
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			8,09

Таблица 8 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Детравенол®» таблетки 1000 мг; аналитическая длина волны 268 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,1739 г	0,0002 г	0,017
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 268 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 268 нм	-	5,30
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			6,69
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			8,57
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			5,36
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,37
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,10
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			8,32

Таблица 9 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Детравенол®» таблетки 1000 мг; аналитическая длина волны 370 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,1739 г	0,0002 г	0,017
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 370 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 370 нм	-	3,80
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			5,41
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			6,09
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			2,80
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,37
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,10
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			5,74

Таблица 10 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Флебавен®» таблетки 1000 мг; аналитическая длина волны 268 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,2357 г	0,0002 г	0,016
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 268 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 268 нм	-	5,30
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			6,61
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			8,51
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			5,36
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,37
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,11
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			8,26

Таблица 11 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Флебавен®» таблетки 1000 мг; аналитическая длина волны 370 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,2357 г	0,0002 г	0,016
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 370 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 370 нм	-	3,80
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			5,33
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			5,80
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			2,29
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,37
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,11
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			5,42

Таблица 12 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Флебодиа®» таблетки 600 мг; аналитическая длина волны 268 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,3624 г	0,0002 г	0,015
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 268 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 268 нм	-	5,30
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			7,01
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			12,08
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			9,84
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,38
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,11
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			11,90

Таблица 13 – Прогностическая оценка погрешности этапа пробоподготовки при количественном определении диосмина методом УФ-спектрофотометрии (образец сравнения – «Флебодиа®» таблетки 600 мг; аналитическая длина волны 370 нм)

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_X	Относительная ошибка $(\sigma_X/x) \times 100, \%$
1.	Взятие точной навески 1,3624 г	0,0002 г	0,015
2.	Твердо-жидкостная экстракция	-	-
3.	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
4.	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
5.	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
6.	Измерение оптической плотности при 370 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
7.	Погрешность величины удельного показателя поглощения при 370 нм	-	3,80
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средСМЕ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, ChemMetr Evaluation 1.0)			5,21
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}, \%$ (экспериментальная)			7,57
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробСМЕ}}, \%$ (ChemMetr Evaluation 1.0)			5,49
Предел сходимости расчетный $RSD_r, \%$ (уравнение Горвица)			1,38
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{средГ}}, \%$ (без учета пробоподготовки, уравнение Горвица)			3,11
Относительная ошибка пробоподготовки $\varepsilon_{\text{пробГ}}, \%$ (уравнение Горвица)			7,29

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Матрица эксперимента и экспериментальные данные по экстракции диосмина и верапамила (с применением компьютерной программы «ChemPlan 1.0»)

Таблица 1 – Матрица эксперимента и экспериментальные данные по экстракции диосмина (на примере «Детралекс®» суспензия 1000 мг/10 мл)

Факторы, влияющие на степень извлечения					Степень извлечения диосмина, %	
X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Блок №1	Блок №2
0,02	50,00	10,00	10,00	5,00	95,10	88,10
0,02	0,00	10,00	10,00	5,00	84,10	80,10
0,02	25,00	5,00	10,00	5,00	90,82	80,50
0,02	25,00	20,00	10,00	5,00	83,01	93,27
0,02	25,00	10,00	5,00	5,00	90,20	97,47
0,02	25,00	10,00	20,00	5,00	80,01	90,21
0,02	25,00	10,00	10,00	10,00	83,13	84,38
0,02	25,00	10,00	10,00	0,00	92,51	82,42
0,05	25,00	5,00	5,00	5,00	77,70	58,01
0,05	25,00	20,00	5,00	5,00	63,91	65,40
0,05	25,00	5,00	20,00	5,00	67,12	64,32
0,05	25,00	20,00	20,00	5,00	63,46	66,26
0,05	50,00	10,00	10,00	10,00	75,96	60,36
0,05	0,00	10,00	10,00	10,00	67,33	69,18
0,05	50,00	10,00	10,00	0,00	75,33	63,74
0,05	0,00	10,00	10,00	0,00	81,67	58,64
0,05	25,00	10,00	5,00	10,00	70,36	71,43
0,05	25,00	10,00	20,00	10,00	69,84	67,80
0,05	25,00	10,00	5,00	0,00	77,92	70,59
0,05	25,00	10,00	20,00	0,00	78,16	64,22
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	67,77	67,66
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	70,50	61,48
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	69,45	74,89
0,05	50,00	5,00	10,00	5,00	71,05	67,59
0,05	0,00	5,00	10,00	5,00	73,34	69,65
0,05	50,00	20,00	10,00	5,00	71,88	65,83
0,05	0,00	20,00	10,00	5,00	70,75	59,42
0,05	25,00	5,00	10,00	10,00	72,83	64,92
0,05	25,00	20,00	10,00	10,00	74,19	62,18
0,05	25,00	5,00	10,00	0,00	72,55	71,45
0,05	25,00	20,00	10,00	0,00	80,62	72,69
0,05	50,00	10,00	5,00	5,00	76,10	71,59
0,05	0,00	10,00	5,00	5,00	81,63	81,63
0,05	50,00	10,00	20,00	5,00	77,77	74,06
0,05	0,00	10,00	20,00	5,00	79,39	79,53
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	76,47	76,09
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	78,25	77,78

0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	75,49	81,36
0,10	50,00	10,00	10,00	5,00	56,53	53,16
0,10	0,00	10,00	10,00	5,00	61,21	59,03
0,10	25,00	5,00	10,00	5,00	63,55	52,37
0,10	25,00	20,00	10,00	5,00	59,34	57,60
0,10	25,00	10,00	5,00	5,00	61,04	48,08
0,10	25,00	10,00	20,00	5,00	54,69	54,65
0,10	25,00	10,00	10,00	10,00	64,38	52,34
0,10	25,00	10,00	10,00	0,00	56,83	54,35

Таблица 2 – Матрица эксперимента и экспериментальные данные по экстракции диосмина (на примере «Венарус®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 900 мг)

Факторы, влияющие на степень извлечения					Степень извлечения диосмина, %	
X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Блок №1	Блок №2
0,02	50,00	10,00	10,00	5,00	98,73	100,93
0,02	0,00	10,00	10,00	5,00	100,79	99,81
0,02	25,00	5,00	10,00	5,00	99,79	94,96
0,02	25,00	20,00	10,00	5,00	96,62	98,78
0,02	25,00	10,00	5,00	5,00	97,77	96,79
0,02	25,00	10,00	20,00	5,00	97,81	99,18
0,02	25,00	10,00	10,00	10,00	100,56	99,56
0,02	25,00	10,00	10,00	0,00	95,68	100,30
0,05	25,00	5,00	5,00	5,00	80,65	87,82
0,05	25,00	20,00	5,00	5,00	79,73	88,59
0,05	25,00	5,00	20,00	5,00	78,19	85,02
0,05	25,00	20,00	20,00	5,00	82,79	79,41
0,05	50,00	10,00	10,00	10,00	85,06	82,83
0,05	0,00	10,00	10,00	10,00	86,52	82,03
0,05	50,00	10,00	10,00	0,00	88,15	86,63
0,05	0,00	10,00	10,00	0,00	80,96	78,36
0,05	25,00	10,00	5,00	10,00	82,16	81,38
0,05	25,00	10,00	20,00	10,00	86,31	86,55
0,05	25,00	10,00	5,00	0,00	88,18	79,47
0,05	25,00	10,00	20,00	0,00	87,27	88,52
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	86,40	82,62
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	85,84	87,73
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	82,73	79,53
0,05	50,00	5,00	10,00	5,00	88,33	82,52
0,05	0,00	5,00	10,00	5,00	78,01	86,40
0,05	50,00	20,00	10,00	5,00	87,39	83,54
0,05	0,00	20,00	10,00	5,00	87,36	81,43
0,05	25,00	5,00	10,00	10,00	80,38	88,56
0,05	25,00	20,00	10,00	10,00	82,28	87,06
0,05	25,00	5,00	10,00	0,00	80,74	85,50
0,05	25,00	20,00	10,00	0,00	81,46	80,36
0,05	50,00	10,00	5,00	5,00	79,18	81,46
0,05	0,00	10,00	5,00	5,00	87,17	77,78
0,05	50,00	10,00	20,00	5,00	77,94	84,43
0,05	0,00	10,00	20,00	5,00	87,77	80,77
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	88,47	86,94
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	82,96	83,49
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	79,64	88,16
0,10	50,00	10,00	10,00	5,00	72,59	76,83
0,10	0,00	10,00	10,00	5,00	76,76	74,47

0,10	25,00	5,00	10,00	5,00	76,28	75,55
0,10	25,00	20,00	10,00	5,00	75,24	74,13
0,10	25,00	10,00	5,00	5,00	73,46	77,00
0,10	25,00	10,00	20,00	5,00	77,13	73,70
0,10	25,00	10,00	10,00	10,00	75,95	73,75
0,10	25,00	10,00	10,00	0,00	76,18	75,27

Таблица 3 – Матрица эксперимента и экспериментальные данные по экстракции диосмина (на примере «Детравенол®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 1000 мг)

Факторы, влияющие на степень извлечения					Степень извлечения диосмина, %	
X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Блок №1	Блок №2
0,02	50,00	10,00	10,00	5,00	99,84	98,21
0,02	0,00	10,00	10,00	5,00	96,17	96,47
0,02	25,00	5,00	10,00	5,00	99,57	100,50
0,02	25,00	20,00	10,00	5,00	94,73	96,92
0,02	25,00	10,00	5,00	5,00	99,92	97,96
0,02	25,00	10,00	20,00	5,00	94,79	100,42
0,02	25,00	10,00	10,00	10,00	95,91	97,17
0,02	25,00	10,00	10,00	0,00	95,78	96,64
0,05	25,00	5,00	5,00	5,00	79,47	88,67
0,05	25,00	20,00	5,00	5,00	77,78	78,51
0,05	25,00	5,00	20,00	5,00	83,96	84,04
0,05	25,00	20,00	20,00	5,00	83,84	80,17
0,05	50,00	10,00	10,00	10,00	83,04	87,84
0,05	0,00	10,00	10,00	10,00	86,92	82,84
0,05	50,00	10,00	10,00	0,00	85,23	84,34
0,05	0,00	10,00	10,00	0,00	85,49	82,33
0,05	25,00	10,00	5,00	10,00	86,83	88,27
0,05	25,00	10,00	20,00	10,00	81,17	87,06
0,05	25,00	10,00	5,00	0,00	78,14	80,48
0,05	25,00	10,00	20,00	0,00	84,01	78,59
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	88,15	84,36
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	81,26	79,20
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	84,13	83,51
0,05	50,00	5,00	10,00	5,00	77,85	85,59
0,05	0,00	5,00	10,00	5,00	82,66	81,26
0,05	50,00	20,00	10,00	5,00	80,59	85,25
0,05	0,00	20,00	10,00	5,00	87,41	87,55
0,05	25,00	5,00	10,00	10,00	86,66	77,90
0,05	25,00	20,00	10,00	10,00	78,72	79,87
0,05	25,00	5,00	10,00	0,00	83,61	86,66
0,05	25,00	20,00	10,00	0,00	82,26	78,60
0,05	50,00	10,00	5,00	5,00	87,46	85,92
0,05	0,00	10,00	5,00	5,00	87,34	81,04
0,05	50,00	10,00	20,00	5,00	86,37	78,84
0,05	0,00	10,00	20,00	5,00	86,62	88,84
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	83,78	87,30
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	87,55	79,61
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	79,05	79,33
0,10	50,00	10,00	10,00	5,00	77,46	75,35
0,10	0,00	10,00	10,00	5,00	72,45	73,31

0,10	25,00	5,00	10,00	5,00	77,09	75,90
0,10	25,00	20,00	10,00	5,00	74,23	76,56
0,10	25,00	10,00	5,00	5,00	74,38	75,99
0,10	25,00	10,00	20,00	5,00	73,83	76,61
0,10	25,00	10,00	10,00	10,00	75,58	74,79
0,10	25,00	10,00	10,00	0,00	77,62	73,97

Таблица 4 – Матрица эксперимента и экспериментальные данные по экстракции диосмина (на примере «Флебавен®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 1000 мг)

Факторы, влияющие на степень извлечения					Степень извлечения диосмина, %	
X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Блок №1	Блок №2
0,02	50,00	10,00	10,00	5,00	100,91	92,93
0,02	0,00	10,00	10,00	5,00	98,04	93,88
0,02	25,00	5,00	10,00	5,00	95,53	97,58
0,02	25,00	20,00	10,00	5,00	98,19	98,47
0,02	25,00	10,00	5,00	5,00	93,93	99,78
0,02	25,00	10,00	20,00	5,00	96,89	93,67
0,02	25,00	10,00	10,00	10,00	91,73	96,44
0,02	25,00	10,00	10,00	0,00	95,72	95,14
0,05	25,00	5,00	5,00	5,00	71,22	82,56
0,05	25,00	20,00	5,00	5,00	74,15	85,08
0,05	25,00	5,00	20,00	5,00	84,56	78,02
0,05	25,00	20,00	20,00	5,00	78,04	83,02
0,05	50,00	10,00	10,00	10,00	70,64	71,04
0,05	0,00	10,00	10,00	10,00	74,01	80,51
0,05	50,00	10,00	10,00	0,00	82,77	84,93
0,05	0,00	10,00	10,00	0,00	70,62	79,05
0,05	25,00	10,00	5,00	10,00	79,56	85,40
0,05	25,00	10,00	20,00	10,00	74,56	82,16
0,05	25,00	10,00	5,00	0,00	78,08	84,52
0,05	25,00	10,00	20,00	0,00	85,83	75,80
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	72,65	80,16
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	78,55	85,74
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	83,13	70,81
0,05	50,00	5,00	10,00	5,00	80,47	77,83
0,05	0,00	5,00	10,00	5,00	82,30	80,47
0,05	50,00	20,00	10,00	5,00	78,68	73,20
0,05	0,00	20,00	10,00	5,00	70,72	73,50
0,05	25,00	5,00	10,00	10,00	74,72	83,40
0,05	25,00	20,00	10,00	10,00	80,99	72,95
0,05	25,00	5,00	10,00	0,00	83,01	73,73
0,05	25,00	20,00	10,00	0,00	81,07	77,66
0,05	50,00	10,00	5,00	5,00	70,82	75,92
0,05	0,00	10,00	5,00	5,00	72,42	78,11
0,05	50,00	10,00	20,00	5,00	73,77	82,97
0,05	0,00	10,00	20,00	5,00	75,19	70,90
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	83,59	84,10
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	71,42	72,46

0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	79,19	71,20
0,10	50,00	10,00	10,00	5,00	59,63	54,05
0,10	0,00	10,00	10,00	5,00	57,87	65,78
0,10	25,00	5,00	10,00	5,00	55,89	55,34
0,10	25,00	20,00	10,00	5,00	54,15	54,07
0,10	25,00	10,00	5,00	5,00	56,97	54,33
0,10	25,00	10,00	20,00	5,00	63,61	65,89
0,10	25,00	10,00	10,00	10,00	60,64	55,81
0,10	25,00	10,00	10,00	0,00	63,37	50,62

Таблица 5 – Матрица эксперимента и экспериментальные данные по экстракции диосмина (на примере «Флебофа®» таблетки 600 мг)

Факторы, влияющие на степень извлечения					Степень извлечения диосмина, %	
X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Блок №1	Блок №2
0,02	50,00	10,00	10,00	5,00	96,95	95,75
0,02	0,00	10,00	10,00	5,00	100,66	92,98
0,02	25,00	5,00	10,00	5,00	98,35	93,61
0,02	25,00	20,00	10,00	5,00	99,92	92,32
0,02	25,00	10,00	5,00	5,00	99,06	93,82
0,02	25,00	10,00	20,00	5,00	97,60	94,41
0,02	25,00	10,00	10,00	10,00	95,19	91,72
0,02	25,00	10,00	10,00	0,00	95,16	101,20
0,05	25,00	5,00	5,00	5,00	70,46	76,09
0,05	25,00	20,00	5,00	5,00	70,37	68,45
0,05	25,00	5,00	20,00	5,00	69,68	79,90
0,05	25,00	20,00	20,00	5,00	77,40	82,27
0,05	50,00	10,00	10,00	10,00	76,68	80,23
0,05	0,00	10,00	10,00	10,00	80,75	72,88
0,05	50,00	10,00	10,00	0,00	72,39	75,05
0,05	0,00	10,00	10,00	0,00	81,62	79,37
0,05	25,00	10,00	5,00	10,00	72,01	77,75
0,05	25,00	10,00	20,00	10,00	75,23	74,81
0,05	25,00	10,00	5,00	0,00	78,35	72,80
0,05	25,00	10,00	20,00	0,00	80,58	67,17
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	81,87	66,85
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	70,05	80,64
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	82,57	81,92
0,05	50,00	5,00	10,00	5,00	66,82	80,11
0,05	0,00	5,00	10,00	5,00	79,41	68,71
0,05	50,00	20,00	10,00	5,00	82,64	72,44
0,05	0,00	20,00	10,00	5,00	82,39	70,80
0,05	25,00	5,00	10,00	10,00	78,01	74,00
0,05	25,00	20,00	10,00	10,00	80,98	75,08
0,05	25,00	5,00	10,00	0,00	67,72	82,65
0,05	25,00	20,00	10,00	0,00	75,06	78,61
0,05	50,00	10,00	5,00	5,00	81,07	81,77
0,05	0,00	10,00	5,00	5,00	71,24	74,24
0,05	50,00	10,00	20,00	5,00	83,07	80,85
0,05	0,00	10,00	20,00	5,00	82,09	66,67
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	74,50	75,44
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	79,52	81,81
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	78,00	73,95
0,10	50,00	10,00	10,00	5,00	62,12	61,92
0,10	0,00	10,00	10,00	5,00	64,46	63,02
0,10	25,00	5,00	10,00	5,00	64,14	61,97
0,10	25,00	20,00	10,00	5,00	64,24	66,00

0,10	25,00	10,00	5,00	5,00	60,86	62,71
0,10	25,00	10,00	20,00	5,00	64,38	66,58
0,10	25,00	10,00	10,00	10,00	64,18	65,10
0,10	25,00	10,00	10,00	0,00	62,00	61,49

Таблица 6 – Матрица эксперимента и экспериментальные данные по экстракции диосмина (на примере «Флебодиа®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой 600 мг)

Факторы, влияющие на степень извлечения					Степень извлечения диосмина, %	
X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Блок №1	Блок №2
0,02	50,00	10,00	10,00	5,00	92,24	95,28
0,02	0,00	10,00	10,00	5,00	94,68	97,63
0,02	25,00	5,00	10,00	5,00	94,12	96,9
0,02	25,00	20,00	10,00	5,00	100,6	95,35
0,02	25,00	10,00	5,00	5,00	95,92	99,95
0,02	25,00	10,00	20,00	5,00	97,98	94,4
0,02	25,00	10,00	10,00	10,00	100,3	97,05
0,02	25,00	10,00	10,00	0,00	94,27	94,55
0,05	25,00	5,00	5,00	5,00	70,13	81,85
0,05	25,00	20,00	5,00	5,00	80,42	80,01
0,05	25,00	5,00	20,00	5,00	82,07	67,94
0,05	25,00	20,00	20,00	5,00	80,9	74,23
0,05	50,00	10,00	10,00	10,00	66,87	71,95
0,05	0,00	10,00	10,00	10,00	74,07	68,03
0,05	50,00	10,00	10,00	0,00	67,31	69,08
0,05	0,00	10,00	10,00	0,00	75,29	73,86
0,05	25,00	10,00	5,00	10,00	67,1	77,51
0,05	25,00	10,00	20,00	10,00	83,06	79,09
0,05	25,00	10,00	5,00	0,00	72,07	79,8
0,05	25,00	10,00	20,00	0,00	79,63	79,79
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	74,06	82,7
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	69,68	72,28
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	83,07	68,11
0,05	50,00	5,00	10,00	5,00	72,66	75,69
0,05	0,00	5,00	10,00	5,00	76,27	76,28
0,05	50,00	20,00	10,00	5,00	79,51	70,21
0,05	0,00	20,00	10,00	5,00	72,91	66,68
0,05	25,00	5,00	10,00	10,00	69,17	71,29
0,05	25,00	20,00	10,00	10,00	67,82	81,71
0,05	25,00	5,00	10,00	0,00	68,02	81,47
0,05	25,00	20,00	10,00	0,00	73,91	81,4
0,05	50,00	10,00	5,00	5,00	80,78	69,21
0,05	0,00	10,00	5,00	5,00	77,7	67,1
0,05	50,00	10,00	20,00	5,00	80,43	69,91
0,05	0,00	10,00	20,00	5,00	81,84	68,69
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	82,06	72,66
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	75,1	72,53
0,05	25,00	10,00	10,00	5,00	80,75	77,71
0,10	50,00	10,00	10,00	5,00	59,15	62,35
0,10	0,00	10,00	10,00	5,00	62,84	62,93

0,10	25,00	5,00	10,00	5,00	61,92	66,16
0,10	25,00	20,00	10,00	5,00	66	60,68
0,10	25,00	10,00	5,00	5,00	60,6	60,85
0,10	25,00	10,00	20,00	5,00	62	59,95
0,10	25,00	10,00	10,00	10,00	59,19	59,06
0,10	25,00	10,00	10,00	0,00	62,32	60,16

Таблица 7 – Матрица эксперимента и экспериментальные данные по экстракции верапамила из крови

Факторы, влияющие на степень извлечения						Степень извлечения Верапамила, %	
X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	Блок №1	Блок №2
7,0	9,0	5,0	5,0	5,0	0,5	67,40	73,52
7,0	0,0	5,0	5,0	5,0	0,5	67,68	67,26
7,0	9,0	5,0	20,0	5,0	0,5	73,21	69,80
7,0	0,0	5,0	20,0	5,0	0,5	66,08	68,83
7,0	2,3	5,0	5,0	10,0	0,5	66,82	61,98
7,0	2,3	5,0	20,0	10,0	0,5	75,01	69,04
7,0	2,3	5,0	5,0	0,0	0,5	77,05	61,24
7,0	2,3	5,0	20,0	0,0	0,5	57,55	66,98
7,0	2,3	2,0	10,0	5,0	1,0	57,11	62,02
7,0	2,3	10,0	10,0	5,0	1,0	62,45	61,74
7,0	2,3	2,0	10,0	5,0	2,0	56,71	71,25
7,0	2,3	10,0	10,0	5,0	2,0	63,59	64,40
9,0	9,0	2,0	10,0	10,0	0,5	89,70	94,85
9,0	0,0	2,0	10,0	10,0	0,5	92,21	91,33
9,0	9,0	10,0	10,0	10,0	0,5	91,35	91,30
9,0	0,0	10,0	10,0	10,0	0,5	93,10	94,10
9,0	9,0	2,0	10,0	0,0	0,5	91,72	96,51
9,0	0,0	2,0	10,0	0,0	0,5	89,11	92,89
9,0	9,0	10,0	10,0	0,0	0,5	90,23	92,20
9,0	0,0	10,0	10,0	0,0	0,5	79,21	84,91
9,0	2,3	2,0	5,0	5,0	1,0	88,17	80,75
9,0	2,3	10,0	5,0	5,0	1,0	80,56	84,83
9,0	2,3	2,0	20,0	5,0	1,0	82,85	81,90
9,0	2,3	10,0	20,0	5,0	1,0	78,45	76,54
9,0	2,3	2,0	5,0	5,0	2,0	81,85	86,45
9,0	2,3	10,0	5,0	5,0	2,0	76,90	80,05
9,0	2,3	2,0	20,0	5,0	2,0	83,61	78,35
9,0	2,3	10,0	20,0	5,0	2,0	82,88	83,82
9,0	9,0	5,0	10,0	10,0	1,0	87,64	78,60
9,0	0,0	5,0	10,0	10,0	1,0	83,78	78,38
9,0	9,0	5,0	10,0	0,0	1,0	79,99	79,91
9,0	0,0	5,0	10,0	0,0	1,0	78,55	80,99
9,0	9,0	5,0	10,0	10,0	2,0	79,14	79,48
9,0	0,0	5,0	10,0	10,0	2,0	88,86	85,01
9,0	9,0	5,0	10,0	0,0	2,0	81,60	82,92
9,0	0,0	5,0	10,0	0,0	2,0	86,39	79,28
9,0	2,3	5,0	10,0	5,0	0,5	80,10	83,26
9,0	2,3	5,0	10,0	5,0	0,5	83,36	80,66
9,0	2,3	5,0	10,0	5,0	0,5	81,95	89,34
9,0	2,3	5,0	10,0	5,0	0,5	78,94	81,39
9,0	2,3	5,0	10,0	5,0	0,5	79,65	80,29
9,0	2,3	5,0	10,0	5,0	0,5	87,66	85,03

11,0	9,0	5,0	5,0	5,0	0,5	71,57	75,02
11,0	0,0	5,0	5,0	5,0	0,5	83,59	76,02
11,0	9,0	5,0	20,0	5,0	0,5	73,26	79,63
11,0	0,0	5,0	20,0	5,0	0,5	84,35	80,24
11,0	2,3	5,0	5,0	10,0	0,5	79,41	74,16
11,0	2,3	5,0	20,0	10,0	0,5	81,65	80,26
11,0	2,3	5,0	5,0	0,0	0,5	80,57	77,61
11,0	2,3	5,0	20,0	0,0	0,5	78,86	80,62
11,0	2,3	2,0	10,0	5,0	1,0	76,38	80,58
11,0	2,3	10,0	10,0	5,0	1,0	75,87	77,25
11,0	2,3	2,0	10,0	5,0	2,0	78,05	83,35
11,0	2,3	10,0	10,0	5,0	2,0	76,01	76,70