

На правах рукописи

Власова Ирина Васильевна

**Спектрофотометрический анализ неразделенных смесей
(лекарственных и витаминных препаратов)
с применением хемометрических алгоритмов**

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук
02.00.02 аналитическая химия**

Томск – 2011

Работа выполнена на кафедре аналитической химии
Омского государственного университета им. Ф.М. Достоевского.

Научный консультант доктор химических наук, профессор
Вершинин Вячеслав Исаакович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Кузнецов Владимир Витальевич

доктор химических наук, профессор
Романенко Сергей Владимирович

доктор химических наук, профессор
Штыков Сергей Николаевич

Ведущая организация: Пятигорская государственная
фармацевтическая академия

Защита состоится 8 июня 2011 г. В 14.30 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.269.04 при ГОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30, ТПУ, 2 корпус.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке Национального исследовательского Томского политехнического университета по адресу: 634050, ул. Белинского, 53

Автореферат разослан 2011 г.

Ученый секретарь
совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций Д 212.269.04
кандидат химических наук, доцент



Гиндуллина Т.М.

Общая характеристика работы

Актуальность. Спектрофотометрия прочно занимает второе (после хроматографии) место в анализе многокомпонентных смесей органических соединений. Спектрофотометрические методы хорошо обоснованы в теоретическом отношении и широко применяются на практике, обеспечивая достаточно высокие показатели точности и чувствительности. Спектрофотометрию все чаще используют для одновременного определения нескольких аналитов без их предварительного разделения. Проблему неселективности светопоглощения решают, применяя алгоритмы обработки данных, созданные в рамках относительно молодой научной дисциплины – хеометрики. С помощью хеометрических алгоритмов легко рассчитать содержания всех или некоторых компонентов смеси даже при полном наложении их спектров поглощения. Поэтому многоволновая спектрофотометрия, которая долго была теоретически интересным, но редко применяемым на практике методом, теперь успешно конкурирует с хроматографией. Известно, что хроматографическое разделение смесей органических соединений может приводить к сдвигу равновесия между разными формами аналитов, их деструкции и другим нежелательным эффектам, а само разделение иногда идет слишком долго. В таких случаях выходом становится спектрофотометрический анализ неразделенных смесей с использованием хеометрических алгоритмов, в частности метода Фирордта (МФ), метода множественной линейной регрессии (МЛР) и метода проекции на латентные структуры (ПЛС). Именно эти алгоритмы чаще всего применяют в анализе многокомпонентных лекарственных и поливитаминных препаратов, что особенно перспективно и выгодно в случае массового анализа однотипных проб. В экспрессных методиках, позволяющих одновременно определять содержания ряда аналитов, заинтересованы как заводские лаборатории, так и контролирующие организации, поскольку объем поступающей на рынок фармацевтической продукции непрерывно растет, и немалая ее часть не соответствует заявленному составу.

К сожалению, анализ неразделенных смесей с применением хеометрических алгоритмов слабо подкреплён теоретическими исследованиями. Недостаточно развита общая методология анализа, не сопоставлены возможности разных алгоритмов, неизвестны метрологические характеристики методик. Не ясно, какие обучающие выборки оптимальны для построения многомерных градуировок. Мало внимания уделяется проблеме неаддитивности, хотя отклонения от аддитивности светопоглощения (ОА) отмечались многими авторами и характерны для самых разных смесей органических соединений. Неизвестно, применимы ли те или иные хеометрические алгоритмы в анализе неаддитивных смесей; не изучена зависимость систематических погрешностей анализа от величины ОА. Нет

рекомендаций по способам уменьшения или исключения влияния неаддитивности.

Цель данной работы – исследование аналитических возможностей и оптимизация некоторых хеометрических алгоритмов (МФ, МЛР и ПЛС) при их применении в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей органических веществ (лекарственных и витаминных препаратов), в том числе при неаддитивном светопоглощении.

В ходе данной работы следовало решить ряд *частных задач*. А именно:

- проверить, встречаются ли в УФ спектрах поглощения бинарных смесей лекарственных веществ (или витаминов) статистически значимые ОА, оценить их величину, выявить связь ОА с составом смеси и условиями регистрации аналитического сигнала;

- оценить систематические погрешности, вызываемые неаддитивностью светопоглощения в ходе анализа смесей разного типа с применением различных хеометрических алгоритмов, а затем предложить способы снижения этих погрешностей;

- изучить способы формирования обучающих выборок при построении многомерных градуировок, установить, зависит ли оптимальный объем обучающей выборки и способ ее формирования от числа аналитов, а также от аддитивности светопоглощения смесей;

- исследовать влияние разных факторов (число одновременно определяемых аналитов, соотношение их концентраций, присутствие посторонних веществ, выбор спектрального интервала или аналитических длин волн) на точность анализа аддитивных и неаддитивных смесей с применением разных хеометрических алгоритмов;

- сопоставить возможности разных хеометрических алгоритмов и выявить те химико-аналитические задачи, для которых целесообразно применять тот или иной алгоритм;

- на основании проведенных исследований разработать экспрессные методики спектрофотометрического анализа многокомпонентных лекарственных и витаминных препаратов, проверить и аттестовать эти методики.

Научная новизна.

1. Впервые разработан способ оценки предельно допустимых ОА, при которых систематические погрешности анализа бинарных смесей с применением МФ не превышают допустимый уровень. Установлена зависимость систематических погрешностей анализа смесей от величины ОА при аналитических длинах волн (МФ).

2. Предложен, теоретически обоснован и программно реализован новый способ выбора аналитических длин волн (АДВ), позволяющий минимизировать погрешности анализа смесей (МФ), связанные с отклонениями от аддитивности. Предложен способ повышения точности такого

анализа – усреднение результатов, полученных с применением нескольких ранее отобранных наборов АДВ.

3. Предложен, теоретически обоснован и программно реализован новый подход к формированию градуировочных наборов для вычисления коэффициентов по УФспектрам поглощения смесей известного состава. Метод основан на минимизации функционала, характеризующего суммарную случайную погрешность результатов. Вычисленные коэффициенты могут быть применены в анализе аддитивных и неаддитивных смесей с использованием МФ и метода МЛР.

4. Установлена связь правильности и воспроизводимости результатов спектрофотометрического анализа смесей методом ПЛС с объемом обучающей выборки и принципами ее формирования. Определено необходимое и достаточное число модельных смесей (оптимальный объем обучающей выборки) для обеспечения максимально возможной точности анализа смесей, имеющих номинальный состав.

5. Сопоставлены аналитические возможности разных хеометрических алгоритмов в анализе неразделенных смесей по светопоглощению в УФ области. Выявлены химико-аналитические задачи, для которых целесообразно использовать тот или иной алгоритм.

Положения, выносимые на защиту.

1. Возможность применения МФ, МЛР и ПЛС для анализа смесей, в спектрах которых имеются статистически значимые отклонения от аддитивности.

2. Алгоритм прогнозирования возможности одновременного определения методом Фирордта компонентов бинарных смесей с требуемой точностью. Способ прогнозирования систематических погрешностей для анализа неаддитивных смесей с применением МФ.

3. Алгоритм оптимизации условий анализа бинарных смесей по методу Фирордта с учетом отклонений от аддитивности (выбор АДВ). Способ повышения точности анализа смесей по методу Фирордта, основанный на совместном использовании нескольких наборов АДВ.

4. Принципы формирования градуировочных наборов (обучающих выборок) для анализа смесей с применением разных хеометрических алгоритмов (МЛР, ПЛС).

5. Оценки необходимого и достаточного объема обучающей выборки для анализа смеси с заданным числом определяемых компонентов методами МЛР и ПЛС.

6. Комплекс экспрессных спектрофотометрических методик анализа лекарственных и витаминных препаратов сложного состава.

Практическая значимость. Выработаны рекомендации по применению хеометрических алгоритмов (МФ, МЛР и ПЛС) в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей органических веществ. Разра-

ботана программа для быстрого поиска оптимальных условий анализа двухкомпонентных смесей по методу Фирордта. Разработана программа для формирования градуировочных наборов и вычисления коэффициентов поглощения по спектрам смесей методом МЛР. Разработаны спектрофотометрические методики одновременного определения m активных компонентов в серийно выпускаемых лекарственных и витаминных препаратах, а также премиксах, вплоть до $m = 6$. Некоторые методики прошли официальную метрологическую аттестацию и включены в Федеральный реестр методик выполнения измерений. Разработанные методики готовы к использованию в контроле производства лекарственных и витаминных препаратов, а также при их сертификации.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на Международном конгрессе по аналитической химии ICAS-2006 (Москва, 2006), на XVI конференции Euroanalysis (Инсбрук, 2009), на VI и VII международных симпозиумах по хеометрике «Современные методы анализа многомерных данных» (Казань, 2008, Санкт-Петербург, 2010), на сессии Научного Совета Национальной академии наук Украины по проблеме «Аналитическая химия» (Харьков, 2007), на Международной конференции «Аналитическая химия и экология Центральной Азии и Казахстана» (Алматы, 2010), на Всероссийских конференциях «Аналитика России» (Москва, 2004, Краснодар, 2007 и 2009), на Съезде аналитиков России (Москва, 2010), на XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, 2007), на Международном форуме «Аналитика и аналитики» (Воронеж, 2008), на конференциях «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Новосибирск, 2004, Томск 2008), на Всероссийской конференции «Менделеевские чтения» (Тюмень, 2005), на I-м Международном форуме «Актуальные проблемы современной науки» (Самара, 2005), на I Всероссийской конференции по анализу фармацевтической продукции (Москва, 2009), а также на некоторых других конференциях и семинарах.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 22 статьи, в том числе 15 статей – в журналах, входящих в список ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 6 глав, общего заключения, выводов, списка литературы (281 источник) и приложения. Первая глава содержит обзор литературы по тематике работы. Вторая глава посвящена объектам и методикам исследования. Главы 3, 4 и 5 содержат результаты исследований, проведенных на модельных смесях разной сложности и связанных с методами Фирордта (гл. 3), множественной линейной регрессии (гл. 4) и проекции на латентные структуры (гл. 5). В 6-ой главе изложены разработанные методики анализа реальных объектов и приведены результаты их проверки и практического применения. Работа изложена на 275 страницах текста, содержит 42 рисунка, 67 таблиц.

Вклад автора в работы, выполненные в соавторстве, состоял в формировании направления исследований, постановке и реализации основных задач, личном участии во всех этапах исследования, как экспериментальных, так и теоретических, а также в интерпретации результатов.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность своему научному консультанту, д.х.н., проф. В.И. Вершинину, за постоянный интерес к работе, ценные советы при постановке исследования и обсуждении полученных результатов. Автор считает своим долгом выразить особую признательность к.ф.-м.н., доц. Н.А. Исаченко, как основному консультанту по математическим расчетам, а также к.ф.-м.н., доц. С.М. Добровольскому, за интересные идеи по реализации алгоритма МЛР. Автор также выражает благодарность д.ф.-м.н. А.Л. Померанцеву, д.ф.-м.н. О.Е. Родионовой, д.т.н. И.Е. Васильевой за полезное критическое обсуждение материалов диссертации. Автор благодарит своих бывших аспирантов А.В. Шилову, Е.Н. Масякову, А.С. Шелпакову за непосредственное участие в выполнении экспериментов, а студента А.А. Нагаева и своего сына, А.Г. Власова – за участие в написании компьютерных программ. Автор выражает благодарность компании САМО за предоставление лицензионной версии программы Unscrambler.

Исследования проводились при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ (единый заказ-наряд, госконтракт П-1103) и ФЦП «Интеграция». Тематика работы зарегистрирована во ВНИИЦ (№ ГР 01.200.2 04679).

Основное содержание работы

Современные тенденции использования спектрофотометрических методов в анализе смесей органических веществ (на примере лекарственных и витаминных препаратов). Спектрофотометрическое определение органических веществ в их неразделенных смесях по собственному светопоглощению аналитов в УФ-области давно привлекает аналитиков-исследователей, в этой области ежегодно появляются десятки новых публикаций, в частности, посвященных анализу лекарственных и витаминных препаратов. Анализируя эти объекты, приходится решать общие проблемы спектрофотометрии неразделенных смесей – неселективности и неаддитивности аналитических сигналов, необходимости одновременного определения макро- и микрокомпонентов, учета влияния матрицы и т.п. Кроме теоретического интереса, анализ таких смесей представляет и практическую значимость – бурный рост фармацевтической промышленности требует новых, экспрессных и достаточно точных методов контроля качества поступающих на рынок фармпрепаратов. В настоящее время разработано немало методик анализа лекарственных форм и препаратов по их УФ-спектрам поглощения. Наиболее простой способ – определение компонен-

тов по собственному светопоглощению при одной длине волны. Так анализируют препараты, содержащие одно активное вещество. Расширяют возможности спектрофотометрии дифференциальные методы, а также использование производных спектров. Результаты исследований отечественных специалистов в этой области (работы В.Г. Беликова, Е.Н. Вергейчика и др.) позволили включить производную спектрофотометрию в XII Государственную Фармакопею РФ.

Усложнение состава анализируемых объектов требует перехода к многоволновой спектроскопии и применения для обработки спектральных данных алгоритмов регрессионного анализа. Наиболее простым его вариантом является метод Фирордта (МФ), обычно используемый для анализа смесей, содержащих 2–3 компонента. МФ включен во многие фармакопеи, в том числе и в Государственную Фармакопею РФ. Большой вклад в развитие МФ внесли работы А.И.Гриздуба с соавт. Но наибольший интерес в настоящее время вызывают те варианты анализа, в которых для нахождения концентраций компонентов используют результаты измерений оптической плотности в широком спектральном диапазоне, а обработку данных ведут с применением хемометрических алгоритмов. Наиболее популярными алгоритмами являются методы множественной линейной регрессии (МЛР), главных компонент (РСА), проекции на латентные структуры (ПЛС). Последний является примером анализа с построением многомерных градуировок и достаточно широко представлен в работах зарубежных исследователей. В нашей стране недостаточная распространенность соответствующих компьютерных программ и слабое знакомство аналитиков с возможностями хемометрики пока что препятствуют широкому применению этого метода, в том числе и в фармацевтическом анализе. В этой связи следует отметить работы А.Л.Померанцева и О.Е.Родионовой, в которых авторы одними из первых продемонстрировали возможности хемометрических алгоритмов при выявлении фальсифицированных лекарств. Недостатком методик количественного анализа с применением алгоритма ПЛС является длительная и трудоемкая процедура формирования больших обучающих выборок для построения на их основе многомерных градуировок. В литературе вопрос о том, как оптимизировать стадию предварительной подготовки образцов, каково минимальное количество образцов, необходимое для анализа того или иного объекта, практически не освещен. Между тем, надежность аналитического метода в значительной мере зависит от того, какие данные были использованы для построения и проверки соответствующей модели. Мало в литературных источниках сведений и о метрологических характеристиках разработанных методик. Все это указывает на недостаточно проработанную общую методологию современного спектрофотометрического анализа смесей с применением хемометрических алгоритмов. Ее развитие, как в теоретическом, так и в практическом плане, представляется весьма актуальной

задачей, решение которой позволит более активно и широко внедрять спектрофотометрию в сочетании с хемотроникой в практику анализа многокомпонентных смесей, в частности, фармпрепаратов.

Объекты и методики исследований

Объектами анализа в настоящей работе являлись некоторые лекарственные и витаминные препараты сложного состава, а также витаминные добавки к кормам – премиксы. **Объекты определения** составляли две группы. В *первую* вошли лекарственные вещества: анальгин (Ан), хинина гидрохлорид (ХГ), кофеин (Кф), парацетамол (Пр), папаверина гидрохлорид (ПГ), дибазол (Дб), ацетилсалициловая кислота (АСК), фенотбарбитал (Фб). В состав *второй* группы вошли водорастворимые витамины: тиамингидрохлорид (витамин В₁), рибофлавин (витамин В₂), пантотеновая кислота (витамин В₃), никотиновая кислота (витамин В₅), пиридоксина гидрохлорид (витамин В₆), виасол (витамин К₃), аскорбиновая кислота (витамин С). Соединения первой группы являются самостоятельными лекарственными средствами, а также входят в состав различных лекарственных препаратов, как правило, многокомпонентных. Соединения второй группы (витамины) входят в состав многокомпонентных витаминных препаратов, а также добавок к кормам – премиксов. **Объектами исследования** были модельные смеси лекарственных веществ (2–4 компонента), и смеси витаминов (4–6 компонентов). Рабочие растворы смесей витаминов готовили в среде 0,01М НСl, смесей ПГ-Дб – в среде 0,01М NaOH, остальные смеси – в дистиллированной воде, с добавлением соответствующих буферных растворов (фосфатный, аммиачный); рН среды был подобран с учетом кислотно-основных свойств веществ и обеспечивал устойчивость растворов смесей в течение нескольких дней. Исключение составляли растворы смесей, содержащие Ан, их использовали в течение первых 30 мин после приготовления. Среди смесей обязательно присутствовали такие, в которых соотношение компонентов отвечало составу реальных объектов, т.е. лекарственных или витаминных препаратов (смеси номинального состава). Готовили также модельные смеси, в которых содержания всех или некоторых компонентов отличались от номинальных значений на $\pm(10-50)\%$. Часть этих смесей использовали в качестве стандартных для формирования обучающих выборок. По остальным смесям (тестовым) проверяли правильность результатов анализа. По результату определения i -го компонента j -ой тестовой смеси вычисляли относительную погрешность его определения (далее δ_{ij}), а взятые по модулю погрешности определения каждого компонента усредняли по g тестовым смесям данного набора:

$$\bar{\delta}_{ij} = g^{-1} \sum_{j=1}^{j=g} |\delta_{ij}|. \quad (1)$$

Кроме того, рассчитывали обобщенную по m компонентам данной смеси характеристику погрешности анализа:

$$\xi = \sqrt{\sum_{i=1}^{i=m} (\bar{\delta}_i)^2} . \quad (2)$$

Все смеси готовили не менее трех раз, спектры поглощения снимали на спектрофотометре СФ-2000, в кварцевых кюветах толщиной 10,0 мм, в диапазоне 200–500 нм с шагом 0,2 нм. Прецизионность измерений в диапазоне значений оптической плотности 0,1–0,8 характеризуется величиной S_r порядка 0,005. В качестве примера приведены спектр раствора номинальной 4-компонентной смеси лекарственных веществ и спектры растворов компонентов в тех же концентрациях, что и в смеси (рис. 1, А).

Для оценки аддитивности светопоглощения модельных смесей использовали $3S$ -критерий. Статистически значимыми ($\alpha = 0,05$) считали те отклонения от аддитивности, для которых выполнялось условие $\Delta A = |A_{\Sigma} - \Sigma A| > 3S$. Здесь A_{Σ} – оптическая плотность смеси, ΣA – сумма оптических плотностей компонентов, взятых порознь в тех же концентрациях и в тех же условиях регистрации сигнала. Статистически значимые ΔA были выявлены в спектрах бинарных смесей ПГ-Дб и Кф-Ан с разным соотношением компонентов, в спектрах 4-компонентных смесей Ан-Дб-ПГ-Фб (рис. 1, Б), а также в спектрах 5–6-компонентных смесей витаминов. Вероятная причина неаддитивности смесей, содержащих ПГ и Дб, – взаимодействие компонентов между собой с образованием ассоциатов. Неаддитивность смесей на основе Ан обусловлена неустойчивостью растворов Ан и его способностью со временем окисляться, причем скорость окисления зависит от концентрации других компонентов смеси.

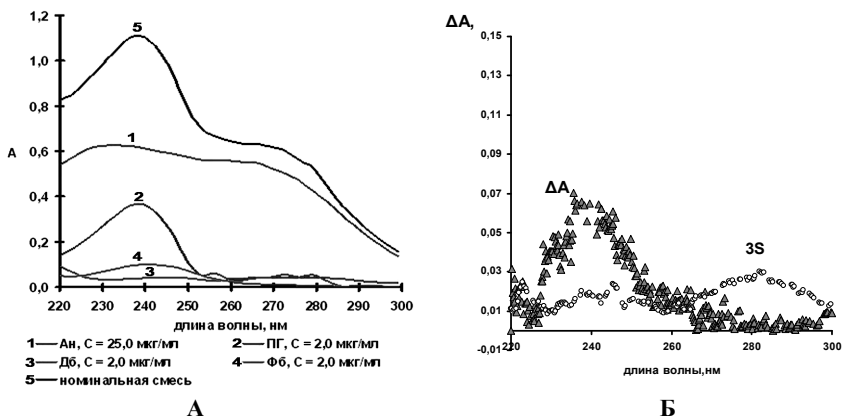


Рис. 1. А – Спектры поглощения растворов Ан, ПГ, Дб, Фб и их смеси.

Б – Проверка аддитивности светопоглощения смеси

Обработку спектральных данных вели с применением программных продуктов (табл. 1).

Таблица 1

Программные продукты и их назначение

Программный продукт	Назначение
Microsoft Excel	Вычисление коэффициентов поглощения индивидуальных соединений; компьютерное моделирование спектров аддитивных смесей; статистическая обработка результатов измерений и вычислений ($P = 0,95$).
Optic-Tablet	Расчеты по методу Фирордта: выбор аналитических длин с помощью нового критерия; нахождение концентраций аналитов в модельных растворах и реальных препаратах; вычисление относительных погрешностей определения аналитов; расчет $\Delta A_{\text{крит}}$.
Optic-MLR	Формирование градуировочных наборов для метода МЛР-2; расчет коэффициентов по спектрам стандартных смесей во всем спектральном диапазоне; вычисление концентраций компонентов в анализируемых смесях методом МЛР.
Unscrambler	Построение многомерных градуировок методом ПЛС; вычисление концентраций компонентов в смесях с применением этих градуировок.

Анализ бинарных смесей методом Фирордта

Прогнозирование систематических погрешностей по величине отклонения от аддитивности. Анализ бинарных смесей методом Фирордта ведут, решая систему линейных уравнений:

$$\begin{cases} a_1 \cdot l \cdot c_X + b_1 \cdot l \cdot c_Y = A_1 \\ a_2 \cdot l \cdot c_X + b_2 \cdot l \cdot c_Y = A_2 \end{cases}, \quad (3)$$

где a_1, a_2, b_1, b_2 – коэффициенты поглощения веществ X и Y, соответственно при λ_1 и λ_2 , c_X и c_Y – концентрации X и Y в смеси, l – толщина поглощающего слоя. Выбор АДВ должен обеспечивать хорошую обусловленность матрицы коэффициентов a_1, a_2, b_1, b_2 , т.е. значение $t = l(a_2 b_1 - a_1 b_2)$ должно быть как можно большим. Вычисляют концентрации X и Y, решая систему (3), например, методом Крамера:

$$c_X = (b_1 A_2 - b_2 A_1) t^{-1}, \quad (3a)$$

$$c_Y = (a_2 A_1 - a_1 A_2) t^{-1}. \quad (3б)$$

Если при выбранных АДВ проявляются статистически значимые отклонения от аддитивности ΔA ($A_1^* = A_1 + \Delta A_1$; $A_2^* = A_2 + \Delta A_2$), применение МФ должно приводить к неверным результатам анализа. При анализе «не-

аддитивной» смеси расчет содержаний ведут, используя систему уравнений (4):

$$\begin{cases} a_1 \cdot l \cdot c_X^* + b_1 \cdot l \cdot c_Y^* = A_1^* \\ a_2 \cdot l \cdot c_X^* + b_2 \cdot l \cdot c_Y^* = A_2^* \end{cases} \quad (4)$$

Решение системы (4) приводит к следующим оценкам концентраций компонентов X и Y:

$$c_X^* = (b_1 A_2^* - b_2 A_1^*) t^{-1}, \quad (4a)$$

$$c_Y^* = (a_2 A_1^* - a_1 A_2^*) t^{-1}. \quad (4б)$$

Вычисленные по (3) и (4) концентрации X и Y будут отличаться между собой ($c_X^* = c_X + \Delta c_X$; $c_Y^* = c_Y + \Delta c_Y$). Это позволяет найти зависимость абсолютных погрешностей Δc от величины отклонений от аддитивности:

$$\Delta c_X = (b_1 \Delta A_2 - b_2 \Delta A_1) t^{-1}, \quad (5a)$$

$$\Delta c_Y = (a_2 \Delta A_1 - a_1 \Delta A_2) t^{-1}. \quad (5б)$$

Требования к точности результатов анализа обычно задают в виде предельно допустимых значений *относительных* (а не абсолютных) погрешностей. В рамках выбранной модели можно определить, к каким относительным погрешностям (δc) могут привести отклонения от аддитивности. По определению,

$$\delta c_X = \frac{\Delta c_X}{c_X} \quad (6a); \quad \delta c_Y = \frac{\Delta c_Y}{c_Y}. \quad (6б)$$

Подставляя в (6a) выражения (3a) и (5a), а в (6б) выражение (3б) и (5б), получаем:

$$\delta c_X = \frac{b_1 \Delta A_2 - b_2 \Delta A_1}{b_1 A_2 - b_2 A_1} \quad (7a); \quad \delta c_Y = \frac{a_1 \Delta A_2 - a_2 \Delta A_1}{a_1 A_2 - a_2 A_1}. \quad (7б)$$

Из (7a) и (7б) следует:

1) даже в тех случаях, когда отклонение от аддитивности наблюдается только при одной из АДВ, с систематическими погрешностями должны определяться оба компонента;

2) погрешности анализа будут больше (по модулю), если отклонения при различных АДВ имеют разные знаки;

3) при неизменных значениях ΔA погрешности Δc_X и Δc_Y должны быть тем больше (по модулю), чем меньше значение t , т.е. хуже обусловленность матрицы коэффициентов;

4) рост ΔA ведет к увеличению (по модулю) погрешностей анализа.

Указанные следствия из (5a) и (5б) соответствуют известным теоретическим рекомендациям по выбору АДВ, но сами эти формулы (оценки систематических погрешностей метода Фирордта) в просмотренной литературе найдены не были – вероятно, они выведены впервые. Приведенные

формулы были проверены и подтверждены в компьютерном, а затем и натурном эксперименте на модельных смесях известного состава. Вышеизложенный способ прогнозирования систематических погрешностей можно использовать и в случае смесей с большим числом компонентов.

Прогнозирование возможности одновременного определения аналитов с погрешностями, не превышающими заданный предел. Любой набор АДВ можно считать приемлемым, если его использование позволяет определять аналиты с погрешностями, не превышающими некоторый заданный предел δc^{max} . Однако оценить критические значения отклонений (далее $\Delta A_{крит}$), при превышении которых погрешность определения хотя бы одного из компонентов смеси превысит допустимый предел, алгебраический метод не позволяет. Соответствующие критерии можно найти геометрически, если рассматривать обобщенную погрешность определения обоих аналитов, а не погрешности определения каждого из них в отдельности. На рис.2 показано графическое решение систем (3) и (4). Сплошные прямые заданы уравнениями системы (3). В зависимости от знаков ΔA_1 и ΔA_2 , решением системы уравнений (4) будет точка пересечения одной из четырех пар пунктирных прямых, на рис. 2 это точки K, L, M, N . Точки L и N симметричны относительно Q , то же относится и к точкам M и K . Поэтому в дальнейшем будем считать, что решением системы (4) является либо точка M , что соответствует $A_1^* = A_1 + \Delta A_1$ и $A_2^* = A_2 + \Delta A_2$, либо точка N , что соответствует $A_1^* = A_1 + \Delta A_1$ и $A_2^* = A_2 - \Delta A_2$. Область значений c_X^* и c_Y^* , удовлетворяющих заданной точности анализа, в пространстве концентраций будет представлять собой прямоугольник $ABCD$ с центром в точке Q (рис. 2). Длина диагонали AQ будет обобщенно характеризовать максимально допустимую погрешность определения аналитов X и Y . Ее можно вычислить по теореме Пифагора:

$$AQ = \sqrt{\left(\Delta c_X^{max}\right)^2 + \left(\Delta c_Y^{max}\right)^2}. \quad (8)$$

Если компонент Y в смеси находится в z -кратном избытке ($c_Y = z c_X$), а относительные погрешности определения обоих компонентов не должны превышать (по модулю) один и тот же, заранее заданный предел δc^{max} , то верхние пределы абсолютных погрешностей определения X и Y должны быть следующими:

$$\Delta c_X^{max} = \delta c^{max} \cdot c_X \quad (9a), \quad \Delta c_Y^{max} = z \cdot \delta c^{max} \cdot c_X. \quad (9б)$$

Подстановка (9 а) и (9 б) в (8) приводит к выражению:

$$AQ = \delta c^{max} \cdot c_X \cdot \sqrt{1 + z^2}. \quad (10)$$

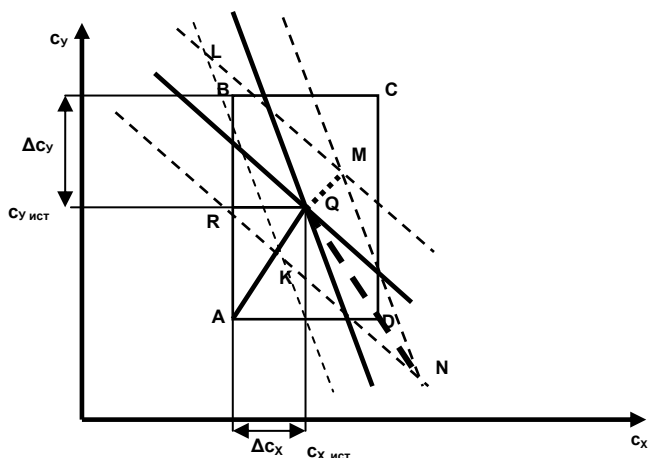


Рис. 2. Графическое решение системы уравнений для нахождения концентраций компонентов методом Фирордта.

Сплошные линии заданы уравнениями системы (3), пунктирные – системы (4).

c_x , c_y – истинные концентрации X, Y (координаты точки Q),

Δc_x , Δc_y – максимально допустимые абсолютные погрешности определения X, Y .

Прямоугольник $ABCD$ – область допустимых концентраций X, Y .

Точки K, L, M, N – решения системы уравнений (4)

Приемлемым решение можно считать только тогда, когда соответствующая ему точка будет принадлежать прямоугольнику $ABCD$. Обобщенной характеристикой погрешности определения c_x и c_y будут являться длины отрезков QN и QM . Сравнивая их с отрезками AQ и RQ , можно оценить, при каких значениях $\Delta A_{крит}$ на выбранном наборе АДВ решение системы уравнений (4), т.е. точка пересечения прямых, будет лежать в пределах прямоугольника $ABCD$, а при каких – наверняка окажется за его границами. Формулы для расчета QN (QM) выведем через ΔA_1 и ΔA_2 и коэффициенты a_1 , a_2 , b_1 , b_2 . Вначале решением систем уравнений (3) и (4) и приняв $l = 1$, найдем координаты точек Q и N (M), а затем по формулам (5а) и (5б) координаты вектора QN (QM), т.е. Δc_x и Δc_y . При ΔA_1 и ΔA_2 одного знака имеем координаты вектора QM , разных знаков – вектора QN . Затем получаем формулы для вычисления длины вектора QM :

$$QM = \sqrt{[(\Delta A_2 b_1 - \Delta A_1 b_2)^2 + (\Delta A_1 a_2 - \Delta A_2 a_1)^2]} \cdot |t^{-1}| \quad (11)$$

и длины вектора QN :

$$QN = \sqrt{[(\Delta A_2 b_1 + \Delta A_1 b_2)^2 + (\Delta A_1 a_2 + \Delta A_2 a_1)^2]} \cdot |t^{-1}|. \quad (12)$$

Допустимые отклонения от аддитивности. Отклонения, позволяющие определять оба компонента с заданной точностью, будем называть допустимыми. Для этого достаточно, чтобы $QN \leq RQ$. С учетом (9а) и (12) получаем неравенство:

$$\sqrt{[(\Delta A_2 b_1 + \Delta A_1 b_2)^2 + (\Delta A_1 a_2 + \Delta A_2 a_1)^2]} \cdot |t^{-1}| \leq \delta c^{\max} c_X. \quad (13)$$

Если рассматривать ΔA_1 , ΔA_2 как координаты точек на плоскости $\Delta A_1 O \Delta A_2$, то неравенство (13) задает на этой плоскости множество, ограниченное эллипсом, причем эллипс расположен так, как показано на рис. 3 (это несложно выяснить, используя методы аналитической геометрии или же методы математического анализа). Областью допустимых значений ΔA_1 , ΔA_2 является часть этого множества, лежащая в первой четверти, на рис. 3 она заштрихована. Из рис. 3 также видно, что максимально допустимому значению ΔA_1 , назовем его $\Delta A_{1\text{крит}}$, соответствует $\Delta A_2 = 0$, и наоборот.

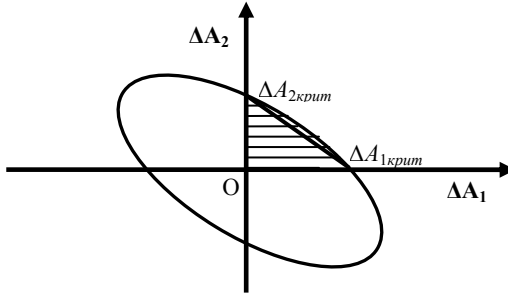


Рис. 3. Графическое решение неравенства (13)

для нахождения допустимых отклонений от аддитивности.

Заштрихована область допустимых значений отклонений от аддитивности

Полагая в (13) $\Delta A_2 = 0$, и заменяя знак неравенства равенством, найдем $\Delta A_{1\text{крит}}$:

$$\Delta A_{1\text{крит}} = \frac{\delta c^{\max} c_X |t|}{\sqrt{a_2^2 + b_2^2}}. \quad (14)$$

Аналогично, полагая $\Delta A_1 = 0$, находим $\Delta A_{2\text{крит}}$:

$$\Delta A_{2\text{крит}} = \frac{\delta c^{\max} c_X |t|}{\sqrt{a_1^2 + b_1^2}}. \quad (15)$$

Отрезок $\Delta A_{1\text{крит}} \Delta A_{2\text{крит}}$ целиком лежит в заштрихованной области. Поэтому вместо криволинейного треугольника $\Delta A_{1\text{крит}} O \Delta A_{2\text{крит}}$, одной из сторон которого является дуга эллипса, можно рассматривать прямолинейный треугольник $\Delta A_{1\text{крит}} O \Delta A_{2\text{крит}}$. Это несколько сужает область допус-

тимых значений ΔA_1 и ΔA_2 , зато упрощает вычисления, а именно: *допустимыми можно считать такие отклонения от аддитивности, которые удовлетворяют условию:*

$$\frac{\Delta A_1}{\Delta A_{1\text{крит}}} + \frac{\Delta A_2}{\Delta A_{2\text{крит}}} \leq 1. \quad (16)$$

При выполнении данного условия наличие отклонений от аддитивности не мешает определению компонентов с заданной точностью, независимо от того, являются отклонения случайными или систематическими.

Недопустимыми отклонениями от аддитивности будем считать такие, при которых, по крайней мере, один компонент наверняка будет определяться с погрешностью, превышающей заданный предел. В этом случае обобщенная характеристика погрешности, QM , превышает AQ , т.е. $QM \geq AQ$. Запишем данное неравенство с учетом (10) и (11):

$$\sqrt{[(\Delta A_1 b_2 - \Delta A_2 b_1)^2 + (\Delta A_2 a_1 - \Delta A_1 a_2)^2]} \cdot |t^{-1}| > \delta c^{\max} \cdot c_X \cdot \sqrt{1+z^2}, \quad (17)$$

и выразим из него ΔA_2 :

$$\Delta A_2 \geq \left[|t| \cdot \sqrt{[\delta c^{\max} c_X (\sqrt{1+z^2})]^2 (a_1^2 + b_1^2) - \Delta A_1^2} + \Delta A_1 (a_1 a_2 + b_1 b_2) \right] \cdot (a_1^2 + b_1^2)^{-1}. \quad (18)$$

Приравняв подкоренное выражение нулю, решим его относительно ΔA_1 . Это и будет максимально допустимое по модулю значение $\Delta A_{1\text{крит}}^*$.

$$\Delta A_{1\text{крит}}^* = \sqrt{1+z^2} \delta c^{\max} c_X \sqrt{a_1^2 + b_1^2}. \quad (19)$$

Аналогично найдем и $\Delta A_{2\text{крит}}^*$:

$$\Delta A_{2\text{крит}}^* = \sqrt{1+z^2} \delta c^{\max} c_X \sqrt{a_2^2 + b_2^2}. \quad (20)$$

Если хотя бы при одной АДВ ΔA будет больше $\Delta A_{\text{крит}}^*$, то обязательно один, а с большой долей вероятности оба компонента будут определяться с погрешностью, превышающей заданный предел. В промежуточных случаях, когда $\Delta A_{\text{крит}} < \Delta A < \Delta A_{\text{крит}}^*$, можно ожидать, что, по крайней мере, один компонент определится с относительной погрешностью, меньшей $\delta c^{\max}$. Более точного прогноза в этом случае сделать нельзя.

Для проверки сделанных выводов был проведен компьютерный эксперимент: 1) вводили численные значения коэффициентов поглощения компонентов смеси при заданных АДВ, концентрации компонентов и максимально допустимую погрешность, равную 4 % отн.; 2) по формулам (14), (15), (19), (20) для каждой АДВ вычисляли значения $\Delta A_{\text{крит}}$ и $\Delta A_{\text{крит}}^*$;

3) задавали значения ΔA_1 и ΔA_2 в долях (α) от $\Delta A_{\text{крит}}$ ($\Delta A_{\text{крит}}^*$), т.е.

$\Delta A = \alpha \Delta A_{\text{крит}}$ ($\Delta A_{\text{крит}}^*$); 4) для каждого компонента вычисляли относительные погрешности, δc_X и δc_Y , используя формулы (7а) и (7б). Данные прогноза возможности (или невозможности) одновременного определения компонентов по величинам ΔA хорошо согласовались с погрешностями, вычисленными при заданных ΔA с применением выведенных алгебраических формул (7а) и (7б). В качестве примера приведем результаты компьютерного эксперимента, выполненные для смеси ХГ-Ан составов 1:1 и 1:4 (табл. 2). Видно, что вывод о необходимости совместно учитывать значения ΔA_1 и ΔA_2 полностью подтвердился.

Таблица 2

Компьютерный эксперимент прогноза возможности определения компонентов смесей ХГ-Ан с погрешностью не более 4 %, по величине ΔA

ΔA в долях (α) от $\Delta A_{\text{крит}}$ ($\Delta A_{\text{крит}}^*$)		Условия	Прогноз	Относительные погрешности, %			
1-ая АДВ	2-ая АДВ			1 : 1		1 : 4	
α_1	α_2			ХГ	Ан	ХГ	Ан
0,3	0,5	1	$\frac{\Delta A_1}{\Delta A_{\text{крит}}} + \frac{\Delta A_2}{\Delta A_{\text{крит}}} \leq 1$ Оба обязательно хорошо	1,7	-2,4	1,7	-0,6
0,5	0,3			2,2	-2,0	2,2	-0,5
1	0			3,6	-1,7	-3,6	0,4
0,7	0,3			2,2	0,0	2,9	-0,6
0,5	0,5			1,2	1,1	-2,4	0,7
1	0			-1,2	3,8	-1,2	1,0
2	0,3	2	Хотя бы один хорошо	3,6	-8,1	3,6	-2,0
1,5	0,5			3,7	-6,5	3,7	-1,6
1,2	0,7			4,0	-5,7	4,0	-1,4
1	0	3	Один обязательно плохо	7,7	-3,6	20,5	-2,4
0	1			-2,4	7,4	-7,1	5,4
1	1			4,6	4,4	13,4	3,0
1,3	0,7			7,4	0,9	21,7	0,7

Погрешности вычисляли с учетом знаков ΔA : 1 и 2 условия – ΔA разных знаков, 3 условие – ΔA одного знака.

Установленные в эксперименте ΔA в спектрах исследованных смесей при АДВ сравнивали с предварительно вычисленными значениями $\Delta A_{\text{крит}}$ и $\Delta A_{\text{крит}}^*$, и определяли, какому из 3-х рассмотренных в компьютерном эксперименте условий они соответствуют. После этого находили концентрации компонентов и вычисляли относительные погрешности. Во

всех случаях наблюдалось хорошее согласование прогноза и реальных погрешностей анализа (табл. 3).

Таблица 3

Проверка прогноза возможности определения компонентов модельных смесей с погрешностью, не превышающей 4 %, по величине ΔA

Аналиты Х-У	Соотношение X : Y	ΔA отвечают условиям	Реальные погрешности, δc , %	
			X	Y
Кф-Пр	1 : 5	2	1,4	-1,5
	1 : 20		1,5	0,9
Кф-Ан	1 : 6	1	1,9	-0,8
	1 : 10	2	-7,5	-1,7
	8 : 1	3	20	-15
ПГ-Дб	1 : 1	1	3,6	0,8
	1 : 4	2	-6,2	-0,8
ХГ-Ан	1 : 4	1	0,7	0,2
	1 : 10	3	16	5,3

Таким образом, предложенный алгоритм прогнозирования допустимых отклонений от аддитивности при определении компонентов бинарных систем по совокупным измерениям аналитического сигнала нашел свое подтверждение на примере анализа смесей методом Фирордта. Возможность проведения анализа с применением одного набора АДВ зависит от соотношения компонентов.

Способы уменьшения влияния неаддитивности на результаты анализа. Выбор аналитических длин волн. Задачей, которая решалась на данном этапе работы, было упрощение алгоритма поиска общих наборов АДВ для одновременного определения компонентов бинарных смесей, как в отсутствие, так и при наличии значимых отклонений от аддитивности.

Влияние случайных погрешностей мы предлагаем учитывать, используя для выбора АДВ коэффициенты вариации W (или значения S_r) при многократном измерении оптической плотности смеси на соответствующих длинах волн. Чем меньше будут значения W_1 и W_2 , тем меньшие (при прочих равных условиях) случайные погрешности следует ожидать при определении X и Y. Желательно, чтобы значения W_1 и W_2 были близки между собой. Необходимо также учитывать *соотношение коэффициентов поглощения компонентов* при выбранных АДВ. С этой целью иногда используют критерий K_0 :

$$K_0 = \cos \alpha = \frac{a_1 \cdot a_2 + b_1 \cdot b_2}{\sqrt{a_1^2 + b_1^2} \cdot \sqrt{a_2^2 + b_2^2}}. \quad (21)$$

В пространстве концентраций величина K_0 соответствует косинусу угла между прямыми (1) и (2), которые описываются уравнениями Фи-

рордта (см. рис. 2). Очевидно, чем ближе к нулю величина K_0 , тем меньше при прочих постоянных условиях будут погрешности определения концентраций.

Если отклонения от аддитивности статистически незначимы, мы предлагаем выбирать АДВ с помощью критерия K^* , который одновременно учитывает величину случайных погрешностей, их соотношение и значения коэффициентов поглощения:

$$K^* = K_0 \cdot \sqrt{W_1^2 + W_2^2} \cdot \frac{W_1}{W_2}, \quad (22)$$

где W_1, W_2 – коэффициенты вариации при параллельных измерениях оптических плотностей смеси на соответствующих длинах волн (нумерация длин волн такова, что $W_1 > W_2$). Оптимальными будут те наборы АДВ, которым соответствуют наименьшие значения критерия K^* . Отметим, что если при разных АДВ коэффициенты вариации статистически не различимы, второй и третий сомножители в формуле (22) не будут влиять на выбор АДВ, он будет определяться лишь соотношением коэффициентов поглощения компонентов (величиной K_0), что согласуется с известными критериями выбора АДВ.

Выбор АДВ при наличии значимых отклонений от аддитивности.

Мы рекомендуем выбирать АДВ с помощью эмпирического критерия K , аналогичного критерию K^* . При вычислении K вместо коэффициентов вариации используем относительные отклонения от аддитивности $\delta A = \Delta A / A$.

$$K = K_0 \cdot \sqrt{\delta A_1^2 + \delta A_2^2} \cdot \frac{\delta A_1}{\delta A_2}. \quad (23)$$

Индексы расставляют так, чтобы выполнялось условие $|\delta A_1| > |\delta A_2|$. Критерий K может иметь как положительные, так и отрицательные значения. Очевидно, чем меньше будут значения δA и чем ближе их отношение к 1, тем меньшими (по модулю) окажутся значения критерия. Именно эти наборы АДВ и следует использовать в анализе. Расчеты по выбору АДВ выполняли с помощью оригинальной компьютерной программы «Optic-Tablet», написанной в пакете Microsoft Excel. В ее основе – последовательный перебор решений системы двух линейных уравнений для разных наборов АДВ. Пользователь вводит действительные концентрации компонентов, длины волн (с шагом 5 нм) и для каждой длины волны – коэффициенты поглощения компонентов, средние значения оптической плотности смеси, а также либо коэффициенты вариации оптической плотности, либо ΔA . Результатами работы программы являются вычисленные для всех наборов длин волн: значения критерия K^* (или K), найденные концентрации (c_X и c_Y), а также относительные погрешности определения каждого ком-

понента, δc , %. В качестве примера на рис. 4 приведены результаты, полученные для неаддитивной смеси ПГ-Дб (1:1). Как видно, для данной смеси существуют такие наборы АДВ, при которых для обоих компонентов одновременно выполняется условие $\delta c \approx 0$. Это наборы, характеризующиеся минимальными значениями критерия K по абсолютной величине ($K \approx 0$). Обычно количество «подходящих» наборов АДВ было довольно большим (10-20), что обеспечивало возможность дальнейшего выбора АДВ.

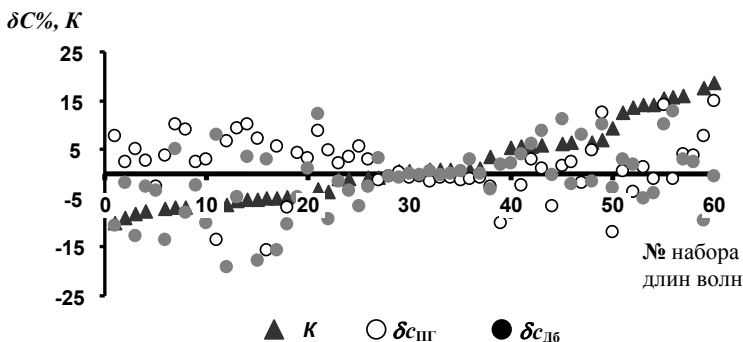


Рис. 4. Значения критерия K и относительных погрешностей (δc , %) определения ПГ и ДБ при использовании разных наборов длин волн ($c_{ПГ} = c_{ДБ} = 5,0$ мкг/мл)

Результаты анализа неаддитивных смесей на АДВ, выбранных с применением критерия (24), приведены в табл. 4. Во всех случаях выбранные АДВ находились вне участков спектра смеси, где отклонения от аддитивности были статистически значимы. Систематические погрешности результатов анализа во всех случаях не превышают 3% отн. и статистически не значимы.

Таблица 4

Анализ неаддитивных смесей на АДВ, выбранных с помощью критерия K

Компоненты Х-У	С, мкг/мл		АДВ, нм	δc , %		S_r (n=3)	
	Х	У		Х	У	Х	У
ХГ-Ан	2,4	14,4	295 / 305	1,0	1,0	0,04	0,04
	2,4	18,2	285 / 310	-1,7	-0,5	0,01	0,02
Кф-Ан	2,4	24,0	250 / 285	-1,9	-2,2	0,04	0,05
	18,2	2,4	250 / 285	1,9	-2,7	0,02	0,08
ПГ-Дб	5,0	5,0	230 / 270	0,5	-0,5	0,04	0,06
	3,0	18,0	235 / 280	-0,4	-1,9	0,03	0,05

Расчеты на всех возможных наборах длин волн позволяют получить большую выборку результатов анализа смеси, не проводя дополнительных

экспериментов. Было изучено статистическое распределение результатов анализа модельных смесей, полученных на разных наборах длин волн. В качестве примера на рис.5 приведены гистограммы распределения результатов анализа модельной смеси ПГ – Дб (1:1). Здесь по оси абсцисс приведены средние значения концентраций аналитов в каждом классе, а по оси ординат – частота повторения результата, что соответствует числу наборов длин волн, на которых получают значения концентраций, попадающие в один класс. Близость распределения результатов к нормальному характеризовали с помощью χ^2 -критерия.

Как видно из приведенных данных, распределение результатов определения компонентов данных смесей имеет характер, близкий к нормальному, значение χ^2 -критерия не превышает критический уровень ($P=0,95$). Наличие достоверного отклонения от аддитивности не влияет на характер распределения результатов. Аналогичные результаты были получены для всех исследуемых систем. Отметим, что значения концентраций, рассчитанные на выбранных по новому критерию АДВ, во всех случаях попадали в центральные классы гистограмм.

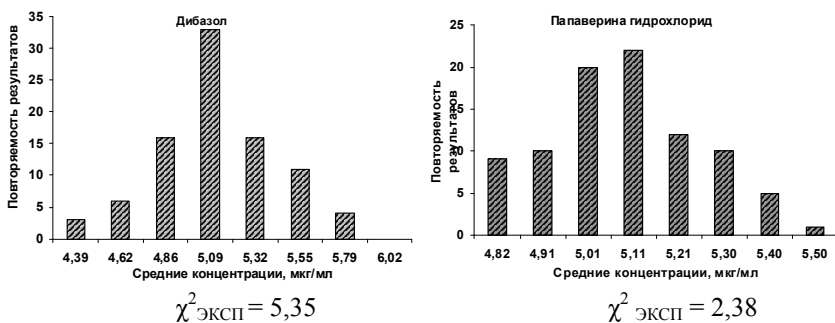


Рис. 5. Гистограммы распределения результатов определения компонентов модельной смеси папаверина гидрохлорид – дибазол.

$$c_{\text{пг}} = c_{\text{дб}} = 5,0 \text{ мкг/мл}, \chi^2_{\text{ТАБЛ}} = 7,78 (P = 0,95).$$

Объем выборки в обоих случаях – 89

Но близость характера распределения к нормальному еще не является доказательством того, что результаты, полученные на разных наборах длин волн, можно рассматривать как независимые. На самом деле они, безусловно, коррелированы, и следовало выяснить степень их корреляции, в первую очередь, на тех наборах длин волн, которым соответствуют минимальные значения критерия. Для этого был проведен корреляционный анализ результатов определения компонентов, вычисленных не менее чем на 15 наборах длин волн с малыми значениями критерия. Данные по некоторым смесям приведены в таблице 5.

Таблица 5

Коэффициенты корреляции результатов определения компонентов на 15 наборах длин волн с малыми значениями критерия $r_{\text{табл}} = 0,51$ ($P=0,95$)

Компонент		Концентрация, мкг/мл		Коэффициент корреляции, $r_{\text{эксп}}$	
1	2	1	2	1	2
ХГ	Ан	3,2	12,8	0,09	-0,04
Кф	Пр	1,6	12,8	0,06	-0,06
Кф	Ан	3,2	19,2	0,04	0,09
ПГ	Дб	2,4	2,4	-0,01	-0,10

Очевидно, корреляцией результатов можно пренебречь – во всех случаях экспериментальные значения коэффициентов корреляции намного меньше $r_{\text{табл}}$. Следовательно, с помощью предложенного критерия можно выбирать несколько наборов АДВ, проводить на них определение и считать полученные результаты независимыми. Такой подход позволяет получить большее количество данных, не проводя дополнительных экспериментов, что сокращает время анализа и делает его дешевле. Для каждой смеси были отобраны по три набора АДВ из числа тех, что характеризовались малыми значениями критерия К. Анализ смесей проводили на каждом наборе АДВ трижды. Дисперсии результатов анализа, полученных на каждом из трех наборов АДВ, во всех случаях были однородны по критерию Кохрена. Средние значения трех выборок статистически не различались (по критерию Стьюдента). Результаты анализа смеси ПГ-Дб на трех наборах АДВ представлены в табл. 6.

Таблица 6

Результаты анализа модельной смеси папаверина гидрохлорид – дибазол с применением трех наборов АДВ ($c_{\text{ПГ}} = c_{\text{Дб}} = 5,0$ мкг/мл, $n=3$)

АДВ, нм	$\delta c, \%$		Sr	
	ПГ	Дб	ПГ	Дб
230 270	0,5	-0,5	0,04	0,06
230 275	-1,5	1,1	0,05	0,02
230 280	0,9	-0,3	0,05	0,07
Средние значения трех выборок	-0,1	0,1	0,01	0,01

Сравнивая результаты, полученные на каждом из наборов с усредненными данными, можно видеть, что при усреднении уменьшается погрешность определения компонентов (вплоть до 0,1 %) и улучшается сходимость, т.е. повышается точность анализа в целом.

Наборы АДВ, выбранные для смесей номинального состава, в дальнейшем были использованы в анализе лекарственных препаратов с тем же соотношением активных компонентов. В связи с этим, необходимо было

проверить, возможно ли применение этих наборов АДВ к анализу смесей с другими концентрациями каждого компонента. Оказалось, что даже при изменении содержания каждого компонента в смеси на $\pm 20\%$, относительная погрешность его определения не превышала 3–4 %. Это позволяет рекомендовать выбранные наборы АДВ для определения содержания активных компонентов в соответствующих лекарственных препаратах. Но при существенных различиях в соотношениях одних и тех же компонентов оптимальные наборы АДВ были разными. Так, Пр и Кф в «Солпадеине» находятся в соотношении 18 : 1, а в «Панадоле» – 8 : 1. Для анализа каждого препарата были подобраны свои наборы АДВ.

Анализ бинарных смесей в присутствии посторонних веществ. В состав таблетированных лекарственных препаратов помимо активных компонентов входят наполнители – гидрокарбонат натрия, крахмал, оксид магния, тальк, глюкоза. Была проведена проверка мешающего влияния этих веществ. Установлено, что в выбранных условиях поглощение водных растворов данных наполнителей при концентрации вплоть до 15 мкг/мл находится на уровне 0,003–0,01, и не превышает 3S значений оптической плотности. Следовательно, указанные наполнители, присутствующие в таблетках, не будут мешать количественному определению исследуемых веществ, что и было подтверждено в эксперименте. В табл. 7 приведены результаты определения компонентов модельных смесей в присутствии глюкозы с концентрацией 10 мкг/мл.

Таблица 7

**Определение компонентов модельных смесей (МФ)
в присутствии глюкозы**

АДВ, нм	Компонент	Введено, мкг	Найдено, мкг	δ , %
235/250; 235/255; 235/260	Ан	40,0	$40,1 \pm 0,1$	2,5
	ХГ	9,7	$9,6 \pm 0,1$	-1,0
245/265; 250/265; 255/265	Кф	15,0	$15,1 \pm 0,1$	0,7
	Пр	15,0	$14,8 \pm 0,3$	-2,7
230/270; 230/275; 230/280	ПГ	30,0	$30,3 \pm 0,3$	1,0
	Дб	32,0	$32,6 \pm 0,2$	2,3

Применение метода множественной линейной регрессии

Метод Фирордта позволяет получать хорошие результаты при анализе бинарных смесей, как в отсутствие, так и при наличии в спектрах отклонений от аддитивности. Но его применение может быть ограничено, если:

- а) в спектре смеси ΔA превышают свои критические значения;
- б) коэффициенты поглощения индивидуальных соединений при всех длинах волн близки между собой, что ведет к плохо обусловленной матрице (значение t слишком мало);

в) соотношение компонентов в анализируемых смесях неизвестно или меняется в очень широком диапазоне, а значит, применение одного и того же набора АДВ не может обеспечить одинаковую точность анализа во всем диапазоне соотношений;

г) требуется определять одновременно более 2–3 аналитов.

Альтернативой МФ может быть метод множественной линейной регрессии (МЛР). Все алгоритмы МЛР основаны на использовании алгебраических уравнений, связывающих оптическую плотность раствора при некоторой длине волны с концентрацией каждого из m определяемых веществ. Используют данные о поглощении компонентов смеси, полученные при p длинах волн ($p \gg m$), а затем решают сильно переопределенную систему уравнений вида

$$A_i = \sum_{j=1}^m a_{ij} \cdot l \cdot c_j. \quad (24)$$

В основе ее решения лежит классический вариант метода наименьших квадратов (МНК). Решением системы будут концентрации, для которых выполняется условие:

$$\sum_{i=1}^p (A_{(\text{эксперим.})i} - \sum_{j=1}^m l \cdot a_{ij} \cdot c_j)^2 \rightarrow \min. \quad (25)$$

Коэффициенты a_{ij} могут быть вычислены по спектрам растворов индивидуальных соединений (вариант прямой градуировки, далее **МЛР-1**), либо по спектрам стандартных смесей (вариант не прямой градуировки, далее **МЛР-2**). Полученные вторым способом коэффициенты a_{ij}^* могут несколько отличаться от молярных или удельных коэффициентов поглощения тех же аналитов при тех же длинах волн. В этом случае a_{ij}^* правильнее называть регрессионными коэффициентами.

Заложенный в пакете Excel алгоритм регрессионного анализа предусматривает решение только линейного варианта множественной регрессии. Для его применения необходимо выполнение основного закона светопоглощения и аддитивности оптической плотности анализируемой смеси. Но в спектрах части исследованных смесей присутствовали неаддитивные участки. Следовало выяснить: какой может быть точность анализа с применением алгоритма МЛР, особенно при неаддитивном светопоглощении компонентов; сколько аналитов могут быть определены методом МЛР с погрешностью, не превышающей среднюю погрешность спектрофотометрического анализа, т.е. порядка 5 % отн.

Применение метода МЛР-1. Вычисление концентраций методом МЛР-1 с применением всего спектрального диапазона для большинства исследованных аддитивных смесей не дало хороших результатов. Исключение

составляли смеси Пр-Кф: при всех соотношениях, вплоть до 20-кратного избытка Пр, оба компонента определяются с погрешностью, не превышающей 5 % отн. В остальных случаях точное определение компонентов бинарных систем оказалось возможным при достаточно узком варьировании соотношений, например, в смесях Кф-Ан определение компонентов с погрешностями менее 5 % отн. возможно только при их соотношении 1:1, в смесях Хг-Ан – от 1 : 1 до 1 : 4. С увеличением концентрации одного из компонентов ошибки достигали 15–20 %. Анализ 3-компонентных смесей Кф, Пр и АСК позволял определять с погрешностью, не превышающей 5 % отн, как правило, только один из компонентов, чаще всего – Кф. Систематические погрешности определения Пр составляли 6–15 % отн., АСК – 8–20 % отн.

Еще больше были систематические погрешности анализа неаддитивных смесей, как, например, ПГ-Дб, Ан-Дб-ПГ-Фб или 5-6-компонентных смесей витаминов. Так, погрешности определения Дб во всех модельных смесях превышали 10–15 % отн. В 4-6 компонентных системах с погрешностью менее 5 % отн. удавалось определить один, реже – два компонента. Как правило, это были компоненты, чей вклад в светопоглощение смеси был основным, например, Ан в системе Ан-Дб-ПГ-Фб, или витамин В₅ – в системе В₁-В₂-В₅-В₆-К₃. Таким образом, результаты анализа практически всех смесей, как аддитивных, так и неаддитивных, с применением метода МЛР-1 ко всему спектральному диапазону оказались неудовлетворительными. Причиной этого не могли быть эффекты только неаддитивности или нелинейности отклика. Вероятнее всего, причина заключается в использовании слишком широких спектральных интервалов. В этом случае для расчета концентраций используются коэффициенты не только в максимумах поглощения отдельных компонентов, но и в тех областях спектра, где они поглощают слабо, т.е. где их коэффициенты поглощения близки к нулю. При малых значениях коэффициентов случайные погрешности измерений оптической плотности будут вносить существенно больший вклад в общую погрешность анализа. Полученные результаты согласуются с известными литературными данными, согласно которым в спектрах многокомпонентных систем могут быть участки, использование которых не только бесполезно, но и вредно, т.к. не позволяет получить достоверные оценки содержания аналитов даже при аддитивности светопоглощения. Следовательно, для снижения погрешности анализа смесей по методу МЛР необходимо проводить дополнительную оптимизацию спектральных диапазонов, и прежде всего, исключать неаддитивные участки спектра, а также области, где отмечалось слабое поглощение аналитов.

Анализ бинарных смесей методом МЛР-1 с оптимизацией спектральных диапазонов позволил расширить интервал соотношений, при которых возможно одновременно определять оба компонента с погрешностями, не превышающими 5–6 % отн. В табл. 8 приведены результаты анализа адди-

тивных (ХГ-Ан) и неаддитивных (ПГ-Дб, Кф-Ан) смесей с использованием оптимизированных диапазонов. В некоторых случаях в зависимости от соотношения аналитов это были разные диапазоны (Кф-Ан, ХГ-Ан).

Таблица 8

**Относительные погрешности (δ , %) определения аналитов
в модельных бинарных смесях методом М.ЛР-1 с применением
оптимизированных спектральных диапазонов**

Аналиты, Х-У	С мкг/мл		Спектральный диапазон, нм	δc_x , %	δc_y , %
	Х	У			
ПГ-Дб	3,6	3,6	240-300	0,4	1,2
	2,4	24		1,2	-6,5
Кф-Ан	25,6	3,2	220-260	0,0	-2,0
	3,2	32	220-265	1,4	-4,2
ХГ-Ан	3,2	3,2	220-320	1,6	2,0
	3,2	25,6	250-320	2,9	-2,3

Компьютерное моделирование спектров аддитивных 3-4-компонентных смесей и оптимизация спектральных диапазонов. Аддитивность светопоглощения растворов 3-4-компонентных смесей дает возможность провести компьютерное моделирование спектров, с их помощью подобрать и проверить спектральные диапазоны без дополнительных затрат на приготовление большого числа модельных смесей. Вначале, используя найденные в эксперименте коэффициенты поглощения и задавая концентрации компонентов, моделировали «идеальный» спектр смеси, получая значения $A_{идеал}$ для каждой АДВ. Затем «возмущали» этот спектр, моделируя случайные погрешности по формуле:

$$A_{возм} = A_{идеал} + \sum_{j=1}^m a_{ij} \cdot I \cdot S_j \cdot c_j \cdot P, \quad (26)$$

где S_j – стандартные отклонения коэффициентов поглощения j -го компонента, которые для каждой длины волны рассчитывали по экспериментальным данным, P – случайное число в интервале от -1 до 1, получаемое с помощью «Генератора случайных чисел» (использовали опцию пакета Excel «Анализ данных»). Совокупность полученных значений оптической плотности при разных длинах волн представляла единичный «возмущенный» спектр отдельной смеси. Всего для каждой смеси получали по 3–5 таких спектров.

Для трехкомпонентных смесей лекарственных веществ АСК, Кф и Пр оптимальным оказался участок 262-300 нм. Погрешности определения всех трех компонентов, как правило, не превышали 4–6 % отн. С целью проверки выбранных диапазонов были приготовлены несколько реальных смесей того же состава, что и в компьютерном эксперименте. Анализ смесей с использованием выбранного диапазона показал хорошее согласование с прогнозом

(табл. 9). Что касается 4-компонентных смесей витаминов, подобрать один спектральный диапазон, чтобы одновременно минимизировать погрешности определения всех четырех компонентов, не удалось.

Таблица 9

Результаты анализа модельных смесей в компьютерном эксперименте (А) и при использовании реальных спектров (Б)

Смесь, №	Аналит	Диапазон, нм	С, мкг/мл	Отн. погрешность, %		$S_r(n=3)$	
				А	Б	А	Б
1	АСК	262-300	10,0	3,7	-2,5	0,02	0,01
	Кф		2,0	1,2	2,8	0,02	0,01
	Пр		10,0	1,4	-0,1	0,006	0,003
2	В ₂	282-301, 367-375	2,4	3,3	5,5	0,001	0,001
	В ₅	210-232	12,0	-1,6	-2,3	0,03	0,05
	В ₆	200-230, 370-375	1,6	-1,6	-2,1	0,001	0,001
	В ₃ *	200-230, 363-375	3,4	1,2	2,7	0,01	0,005

* – по разностному спектру

Для каждого витамина был подобран свой оптимальный интервал длин волн. Как правило, эти интервалы находились вблизи максимумов поглощения соответствующих компонентов. Лишь для витамина В₃ в компьютерном эксперименте не удалось найти диапазон, позволяющий определять его с погрешностью менее 10 % (В₃ дает наименьший вклад в оптическую плотность смесей). Для оптимизации условий его определения применили разностный подход: из оптической плотности смеси вычитали вклад основного компонента – витамина В₅. В разностном спектре удалось найти диапазоны длин волн, где В₃ определяется с погрешностью, не превышающей 5 % отн. Результаты компьютерного эксперимента, как и в случае трехкомпонентных систем, хорошо согласуются с данными анализа реальных смесей (табл. 9). Это позволяет применять предварительное моделирование не только для выбора аналитических длин волн, но и с целью прогнозирования погрешностей анализа аддитивных смесей.

Таким образом, метод МЛР-1 с применением предварительно вычисленных коэффициентов поглощения дает весьма хорошие результаты при анализе бинарных смесей, независимо от их аддитивности, а также аддитивных смесей, содержащих 3–4 аналита. Однако необходимость подбора спектральных диапазонов, а также применение разностных спектров существенно увеличивают время на проведение анализа.

Анализ неаддитивных 5-6-компонентных смесей витаминов. Неаддитивность светопоглощения не позволяет проводить адекватное моделирование спектров, поэтому оптимизацию спектральных диапазонов в этих случаях вели, используя спектры реальных смесей. Примером может быть

подбор спектральных диапазонов для анализа 5-компонентной смеси витаминов: B₂, B₅, B₆, K₃ и B₁. Результаты анализа одной из смесей после оптимизации условий приведены в табл. 10.

Таблица 10

Результаты определения витаминов методом МЛР-1 в модельной смеси с использованием узких спектральных диапазонов (n=3)

Витамин	Диапазоны длин волн, нм	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	$\delta, \%$	Sr
B ₂	220-500	2,2	2,17	-1,5	0,010
B ₅		10,0	9,99	-0,1	0,005
B ₆		1,4	1,36	-2,6	0,023
K ₃ *	220-245	0,7	0,71	0,8	0,011
B ₁ *	220-245, 254-265	0,9	0,85	-6,0	0,020

* - по разностному спектру

Три витамина – B₂, B₅, B₆ – можно определять по методу МЛР-1 с использованием одного и того же широкого спектрального диапазона 220-500 нм. Еще два витамина – K₃ и B₁ – можно определять с требуемой точностью только по разностному спектру, вычитая вклад витамина B₅ из исходного спектра. Аналогичным образом подбирали спектральные диапазоны для 6-компонентных смесей. Однако витамин B₃ в этих смесях не удается точно определить даже по разностному спектру. Независимо от выбранного спектрального диапазона, относительная погрешность определения витамина B₃ в 6-компонентных смесях достигала 20 % и более. Вероятно, это обусловлено наименьшим вкладом данного витамина в суммарное поглощение этой неаддитивной смеси.

Применение метода МЛР-2. Выбор спектрального диапазона – не единственный способ повышения точности регрессионного анализа. Повысить точность анализа можно за счет перехода к варианту непрямой градуировки (МЛР-2). В этом случае вычислять элементы матрицы коэффициентов K необходимо по спектрам N стандартных смесей того же качественного состава, что и анализируемые, но с точно известным содержанием каждого компонента:

$$K = AC^T(C^TC)^{-1}, \quad (27)$$

где A – вектор оптических плотностей смесей при заданной длине волны, C – матрица концентраций $N \times m$ (N – число стандартных смесей). Расчеты по системе (27) повторяют p раз, т.е. столько, сколько длин волн предполагают в дальнейшем использовать для решения системы (25). Основная проблема в этом случае – формирование хорошо обусловленной матрицы концентраций стандартных смесей (C), используемых в качестве градуировочных. Неудачно сформированные выборки могут существенно ухудшить результаты анализа.

В качестве оценки оптимальности составов градуировочных наборов предлагается использовать минимум функционала случайных погрешностей. Теоретическое обоснование проведем, используя методы матричного анализа. Допустим, что приготовление растворов стандартных смесей и измерение их светопоглощения сопряжено с возникновением только случайных погрешностей. Тогда система уравнений, связывающая состав и светопоглощение растворов, в матричной форме будет иметь следующий вид:

$$A = KC + \varepsilon, \quad (28)$$

где ε – вектор погрешностей, включающих в себя случайные погрешности приготовления растворов индивидуальных соединений и их стандартных смесей, погрешности измерения аналитических сигналов и т.п. Будем считать, что распределение совокупных погрешностей является нормальным, эти погрешности не зависят от концентраций C и не коррелируют с числомготавливаемых градуировочных смесей N . Тогда ковариационная матрица остатков $E(\varepsilon^T \varepsilon)$ может быть записана как:

$$\Sigma_{\varepsilon} = \delta^2 I_N, \quad (29)$$

где δ^2 – неизвестная дисперсия компонент вектора ε , а I_N – единичная матрица N -го порядка.

МНК основан на минимизации функционала:

$$Q(K) = \varepsilon^T \varepsilon = (A - KC)^T (A - KC). \quad (30)$$

Точность оценки $\hat{K}$ матрицы K определяется ковариационной матрицей:

$$\begin{aligned} \Sigma_{\hat{K}} &= E \left[(\hat{K} - K)^T (\hat{K} - K) \right] = E \left\{ \left[\varepsilon C^T (CC^T)^{-1} \right]^T \varepsilon C (CC^T)^{-1} \right\} = \\ &= (CC^T)^{-1} C E(\varepsilon^T \varepsilon) C^T (CC^T)^{-1}. \end{aligned} \quad (31)$$

Заменим ковариационную матрицу регрессионных остатков $E(\varepsilon^T \varepsilon)$ с учетом (29), и в конечном итоге получим:

$$\Sigma_{\hat{K}} = \delta^2 I_N (CC^T)^{-1}. \quad (32)$$

Диагональ этой матрицы есть вектор дисперсий оценок $\hat{K}$. При заданной размерности единичной матрицы (N) и постоянной величине δ^2 , основным условием максимальной точности оценивания K будет оптимальность матрицы концентраций C . В качестве оценки оптимальности возьмем минимум суммы дисперсий оценок $\hat{K}$, или, что эквивалентно,

след (*trace*) матрицы $(CC^T)^{-1}$. Тогда сформированный оптимальный план эксперимента обеспечит минимальное суммарное среднеквадратичное отклонение оценок $\hat{K}$ в классе всех планов заданной размерности N :

$$\text{trace}(C^T C)^{-1} \rightarrow \min_{lb \leq C \leq ub}, \quad (33)$$

где lb , ub – матрицы нижнего (*lower bound*) и верхнего (*upper bound*) ограничений.

Реализацию изложенного алгоритма осуществляли с помощью оригинальной программы «Optic-MLR», написанной в пакете MATLAB. Поиск минимума (33) вели с использованием заложенной в MATLAB функции *fmincon*.

Программа «Optic-MLR» состоит из трех модулей. Первый модуль, «GENERATE», предназначен для формирования составов градуировочных наборов по вышеизложенному алгоритму. Предусмотрено два плана формирования наборов, обычный и специальный, с учетом взвешенных коэффициентов для каждого компонента. Входными данными обычного плана являются: число компонентов m ; минимальные и максимальные концентрации каждого компонента в градуировочных смесях (ожидаемые содержания компонентов в анализируемых смесях должны находиться в пределах заданных концентрационных уровней), число градуировочных смесей, от $N = m$ до заданного пользователем верхнего предела. В случае формирования наборов по специальному плану, для каждого компонента дополнительно вводят взвешенный коэффициент, численное значение которого пользователь выбирает самостоятельно. Чем меньший вклад в светопоглощение смеси вносит компонент, тем большее значение коэффициента ему присваивается. Численные значения коэффициентов пользователь задает самостоятельно (пример приведен в табл. 11).

Результатом работы программы являются оптимальные (в указанном выше смысле) концентрации компонентов для каждой стандартной смеси градуировочного набора. Задавая разное число N , пользователь получает в распоряжение несколько градуировочных наборов. В соответствии с рекомендациями программы готовят растворы, и снимают их спектры. Используют полученные результаты для вычисления регрессионных коэффициентов аналитов. Расчеты ведут с применением второго модуля программы «KOEFF_COUNTER». В программу вводят концентрации аналитов и спектры всех градуировочных смесей. Итог работы программы – вычисленные для каждого аналита по всему спектральному диапазону регрессионные коэффициенты.

Третий модуль «CONCENTR_COUNTER» позволяет вычислять концентрации аналитов в исследуемых смесях методом МЛР. Для этого в

программу вводят коэффициенты аналитов (поглощения или регрессионные), спектры анализируемых смесей, и задают границы спектрального диапазона, который будет использован программой для расчета содержания аналитов.

Были проанализированы модельные смеси с разным числом аналитов – от 2 до 6. Для смесей каждого типа формировали ряд градуировочных наборов разного объема. Вычисленные по ним коэффициенты применяли к анализу одних и тех же тестовых смесей.

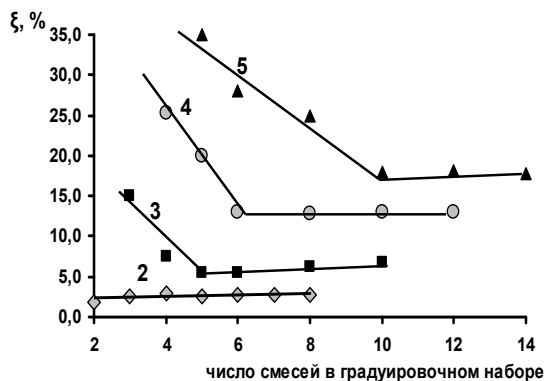


Рис. 6. Зависимость обобщенной погрешности анализа смесей, содержащих 2,3,4 и 5 аналитов, от числа смесей в градуировочных наборах

На рис. 6 показано, как меняется обобщенная погрешность (ξ) анализа смесей, содержащих 2-5 аналитов, в зависимости от числа смесей, используемых для вычисления коэффициентов, т.е. объема градуировочного набора, N . При расчете ξ использовали данные по нескольким (не менее 10) тестовым смесям. Как видно, для бинарных систем в градуировочный набор достаточно включать 2 смеси. Для остальных систем требуется больший объем набора, но не превышающий $2m$. При дальнейшем увеличении объема градуировочного набора погрешности определения компонентов оставались примерно на одном уровне.

Новый способ формирования градуировочных наборов позволил повысить точность анализа тестовых смесей по сравнению с методом МЛР-1. Хорошие результаты были получены даже в случае неаддитивных смесей, а также при анализе смесей, содержащих посторонние соединения, поскольку влияние мешающих факторов сходным образом проявлялось в спектрах стандартных и исследуемых смесей.

Рассмотрим результаты, полученные при анализе неаддитивных бинарных смесей. Набор для вычисления коэффициентов системы ПГ-Д был составлен в соответствии с результатами работы программы, и включал

только две смеси, с максимальными соотношениями ПГ и Дб, а именно 3 : 1 и 1 : 20. Повторный анализ тех же тестовых смесей ПГ и Дб привел к следующим положительным результатам по сравнению с вариантом МЛР-1: во-первых, снизились погрешности определения компонентов; во-вторых, одновременное определение компонентов с погрешностью не более 5 % отн. стало возможным при любых соотношениях ПГ и Дб, от 3 : 1 до 1 : 20 (рис.7); в-третьих, не потребовалась дополнительная оптимизация спектрального диапазона путем исключения неаддитивного участка спектра. Аналогичные результаты получены и для системы Кф-Ан. Составы градуировочных наборов также включали только две смеси, дополнительная оптимизация спектральных диапазонов не потребовалась, погрешности определения аналитов при любых соотношениях (от 5 : 1 до 1 : 10) не превышали 5 % отн., S_r – не более 0,03.

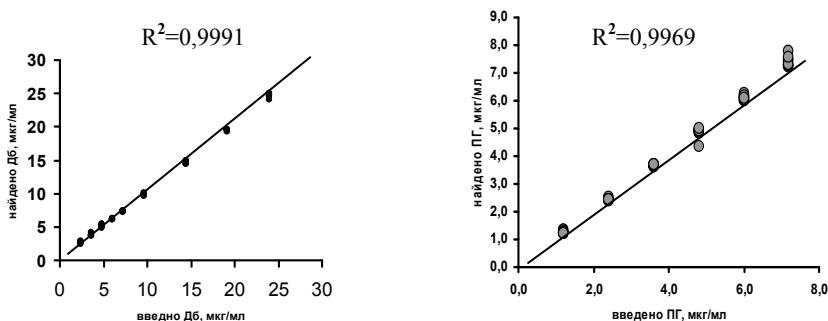


Рис. 7. Результаты анализа модельных смесей папаверина гидрохлорид-дибазол с применением метода МЛР-2

Анализ аддитивных трехкомпонентных смесей АСК-Кф-Пр, содержащих посторонние вещества. Смеси, моделирующие препарат «Цитрамон», содержали, помимо аналитов, лимонную кислоту (ЛК). И хотя поглощение этой кислоты невелико, ее присутствие вело к появлению систематических погрешностей при анализе смесей методом МЛР-1 (табл. 11). При переходе к анализу тех же смесей методом МЛР-2 в стандартные смеси градуировочных наборов добавляли ЛК. Это позволило заметно снизить погрешности. Правда, присутствие ЛК потребовало оптимизации спектрального диапазона для определения Кф. Хорошо воспроизводимые результаты с меньшей погрешностью были получены при использовании для расчета содержания Кф области 240-263 нм. АСК и Пр, как и в отсутствие ЛК, можно было определять, используя весь спектральный диапазон 220-300 нм, без дополнительной его оптимизации.

Таблица 11

**Определение АСК, Кф и Пр в смесях, содержащих лимонную кислоту,
с применением двух вариантов метода МЛР (n=3)**

Аналит	C, мкг/мл	МЛР-1			МЛР-2		
		найдено	$\delta \%$	Sr	найдено	$\delta \%$	Sr
АСК	10,0	13	23	0,003	9,7	-3,3	0,008
Кф	1,5	1,6	7,2	0,001	1,5	3,4	0,051
Пр	5,0	6,7	34	0,006	4,9	-2,0	0,004

Анализ аддитивных 4-компонентных смесей витаминов. Градуировочный набор включал 8 смесей. На рис. 8 приведены зависимости от длины волны коэффициентов поглощения витаминов (слева), и регрессионных коэффициентов, вычисленных по спектрам растворов смесей (справа). Как видно, в целом характер кривых схож, что может служить косвенным доказательством аддитивности светопоглощения изученных смесей. В табл. 12 приведены результаты анализа некоторых смесей, выполненные методом МЛР с применением тех и других коэффициентов. Усредненные погрешности определения отдельных витаминов и обобщенная погрешность убедительно свидетельствуют о повышении точности анализа в случае использования новых коэффициентов. Для расчетов методом МЛР-1 были использованы оптимизированные для каждого витамина диапазоны, методом МЛР-2 расчеты выполнены в одном спектральном диапазоне, 220-300 нм.

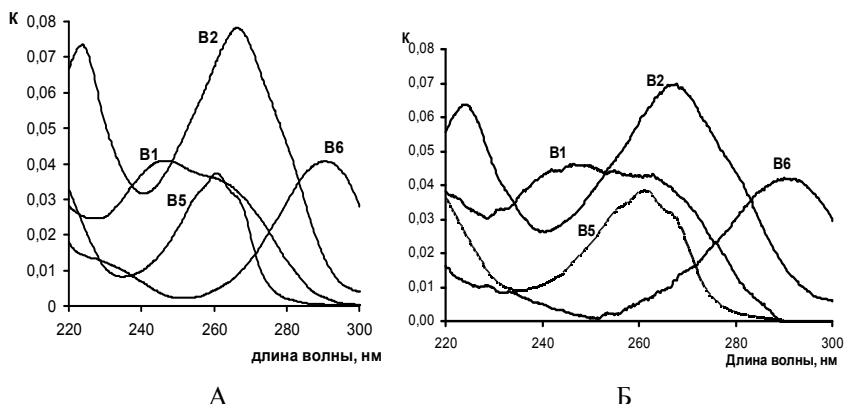


Рис. 8. Коэффициенты поглощения витаминов (А) и регрессионные коэффициенты, вычисленные по спектрам смесей (Б).

Таблица 12

Относительные погрешности определения витаминов в 4-компонентных смесях с применением двух вариантов метода МЛР

Смесь, №	С, мкг/мл				Относительные погрешности $ \delta $ % отн.							
					МЛР-1				МЛР-2			
	B ₁	B ₂	B ₅	B ₆	B ₁	B ₂	B ₅	B ₆	B ₁	B ₂	B ₅	B ₆
1	1,0	1,2	7,0	1,7	6,8	7,0	6,3	2,2	2,8	0,5	4,8	2,6
2	1,2	2,3	7,1	1,0	9,0	8,2	5,0	10,0	1,4	2,7	0,5	2,5
3	1,8	4,0	5,6	2,0	10,0	2,4	6,9	5,7	9,2	1,7	0,0	0,6
4	1,4	1,6	7,1	1,0	5,5	11,0	8,4	0,9	0,8	7,1	1,3	6,6
средняя $ \delta $ % по 4 смесям					7,8	7,1	6,7	4,7	3,6	3,0	1,7	3,0
Обобщенная погрешность, ξ , %					13,4				5,8			

Анализ неаддитивных 4-5-компонентных смесей. В исключительных случаях, как, например, в анализе 4-компонентных смесей лекарственных веществ и 5-компонентных смесей витаминов, даже после оптимизации диапазонов погрешности определения отдельных аналитов оставались недопустимо высокими (см. рис. 6, табл. 13). Для таких систем градуировочные наборы, состоящие из 2*m* смесей, формировали по специальному плану. Результаты анализа с использованием коэффициентов, вычисленных по обычному и специальному планам, представлены в табл. 13. Видно, что переход к специальному плану формирования градуировочных наборов снизил погрешности определения не только «проблемных», но и всех остальных компонентов.

Таблица 13

Правильность и сходимость определения аналитов с применением коэффициентов, вычисленных по разным планам (n=3)

m	Аналит	С, мкг/мл	Обычный план		Специальный план		
			δ , %	S_r	Взвешенный коэффициент	δ , %	S_r
4	Ан	25,0	4,9	0,011	0,1	-0,9	0,008
	ПГ	2,0	5,0	0,017	1	1,9	0,015
	Дб	2,0	-17	0,028	100	2,6	0,010
	Фб	2,0	18	0,015	100	6,6	0,011
5	B ₁	0,3	24	0,012	100	3,8	0,004
	B ₂	0,3	21	0,009	100	2,9	0,003
	B ₅	3,0	-3,9	0,020	1	-1,6	0,010
	B ₆	0,45	4,5	0,070	10	4,3	0,060
	С	11,3	2,9	0,030	0,1	2,9	0,020

Влияние объема спектральных данных на точность анализа методом МЛР-2. При наличии специальной программы, как, например, «Optic-MLR», расчёт коэффициентов аналитов по спектрам смесей не представляет особых трудностей. Если применять стандартный пакет Microsoft Excel, то вычисление коэффициентов, например, в диапазоне 220-300 нм с шагом 0,2 нм может занимать несколько часов. Увеличение шага при регистрации спектров позволит существенно сократить время на данном этапе работы, однако не менее важно оценить, как это отразится на точности анализа. Для выяснения данного вопроса использовали спектры смесей разного состава, зарегистрированные с разным шагом – от 0,2 нм до 16 нм. Оказалось, если компоненты вносят примерно одинаковый вклад в светопоглощение смеси, как, например, в системах ПГ-Дб или В₁-В₂-В₅-В₆, анализ можно вести во всем спектральном диапазоне без предварительной его оптимизации и точность вычисления не ухудшается, даже если увеличивать шаг вплоть до 10 нм. Если вклады компонентов различаются и требуется оптимизация диапазонов, шаг должен быть не более 2 нм. Приведем в качестве примера данные определения витаминов в 6-компонентной смеси, когда содержание слабо поглощающих витаминов В₁ и В₃ определяют с использованием небольших спектральных диапазонов (табл. 14). Видно, что погрешности определения тех витаминов, что ведут с использованием всего спектра, практически не меняются при увеличении шага вплоть до 8 нм, а погрешности определения В₃ и В₁ резко возрастают, начиная уже с шага в 1 и 2 нм соответственно.

Таблица 14

Влияние шага регистрации спектров на точность анализа 6-компонентных смесей витаминов методом МЛР-2

Витамин	С, мкг/мл	Диапазон, нм	Шаг, нм				
			0,2	1	2	4	8
			δ , % отн.				
В ₂	2,6	200-300	3,4	2,7	3,8	4,3	4,9
В ₅	12,0		0,2	0,5	1,4	1,2	1,9
В ₆	1,6		1,0	1,9	2,7	2,5	3,5
К ₃	0,9		4,2	5,7	6,5	6,9	7,1
В ₁	1,1	200-250	5,3	6,2	14	19	23
В ₃	4,0	270-300	3,0	8,4	12	13	15

Итак, именно присутствие слабо поглощающих компонентов будет лимитирующим фактором при выборе шага регистрации. В общем случае, чем сложнее состав смеси (по числу компонентов и различий их поглощательной способности), тем меньший шаг требуется при регистрации спектров.

Подведем краткий итог: метод МЛР в варианте непрямой градуировки позволяет одновременно определять от 2 до 5-6 аналитов, независимо от аддитивности светопоглощения. Вычисленные коэффициенты можно применять к анализу смесей, в которых соотношение компонентов меняется в широком интервале, например, для бинарных систем от 8:1 до 1:10, без дополнительной оптимизации диапазонов. Метод позволяет учесть присутствие посторонних веществ. С целью снижения погрешностей можно, во-первых, проводить оптимизацию спектральных диапазонов, во-вторых, при необходимости формировать градуировочные наборы по специальным планам. Предложенный алгоритм составления градуировочных наборов позволяет ограничить их число в пределах от m до $2m$. В оптимальных условиях расчета концентраций погрешности определения каждого аналита не превышают 3–5 % отн., относительные стандартные отклонения S_r составляют 0,01–0,06.

Применение метода ПЛС в спектрофотометрическом анализе смесей

Принцип метода ПЛС заключается в установлении максимальной ковариации между экспериментальными исходными данными (в нашем случае – матрицей спектров A) и переменными (матрицей концентраций C), значения которых необходимо в будущем предсказывать, причем как можно точнее. Число строк в матрицах A и C равно количеству модельных смесей N . Число столбцов в матрице A равно количеству длин волн p , при которых измерена оптическая плотность, в матрице C – количеству компонентов m . Проводится одновременная декомпозиция матриц A и C по формулам:

$$A = TP^t + E, \quad (34)$$

$$C = UQ^t + F, \quad (35)$$

где T и U – матрицы счетов, P и Q – матрицы нагрузок, E и F – матрицы остатков.

Для построения градуировочной модели (многомерной градуировки) методом ПЛС используют стандартные смеси, называемые обучающей выборкой. Проверку градуировок ведут с использованием тестовых смесей, по составу однотипных со смесями из обучающей выборки. Если все аналиты, входящие в состав тестовых смесей, можно одновременно определять с погрешностью, не превышающей некоторый заданный предел, то считают, что построена адекватная многомерная градуировка, которая соответствует требованиям точности анализа.

В случае анализа смесей с известным номинальным составом, при формировании обучающих выборок нами были приняты следующие условия:

- для каждого компонента известен диапазон возможных содержаний;
- для каждой смеси определены допустимые соотношения компонентов;

Отбор смесей для формирования обучающих выборок одного и того же объема вели разными способами, сопоставляя следующие принципы:

А – случайный отбор смесей;

В – целенаправленный отбор смесей, в которых содержания компонентов были равномерно распределены в области их возможных соотношений.

С – целенаправленный отбор смесей с учетом номинального состава моделируемого препарата и с обязательным включением в выборки номинальной смеси.

При построении всех многомерных градуировок использовали один спектральный диапазон (220-300 нм), без дополнительной оптимизации, шаг вводимых спектральных данных составлял 0,2 нм. Проверку построенных градуировок вели с использованием тестовых смесей, не менее 10-ти для каждой системы. Результаты анализа тестовых смесей разного типа с использованием выборок, сформированных по трем принципам, представлены в табл. 15.

Таблица 15

Результаты анализа смесей разного типа с использованием выборок, сформированных по трем принципам

Число смесей в выборке	Число анализов	ξ , % отн		
		А	В	С
5	2	4,6	3,2	5,1
6	3	16	17	13
11	6	35	25	16

Для бинарных смесей хорошие результаты получены с применением всех трех градуировок – оба компонента определяются с погрешностью меньше 5 % отн. Для 3-и 6-компонентных смесей включение в состав выборки номинальной смеси (принцип С) приводит к заметному снижению относительных погрешностей определения каждого компонента, а, следовательно, и обобщенной погрешности. Таким образом, можно констатировать, что принцип формирования обучающих выборок, действительно, влияет на точность предсказания содержаний компонентов в тестовых смесях, причем большое значение имеет включение в выборки смеси номинального состава. Вторым необходимым условием является объем выборки. Влияние этого фактора оценивали, меняя число смесей в обучающих выборках, но соблюдая принципы их формирования. Примером могут быть результаты анализа тестовых смесей, содержащих три лекарственных вещества АСК-Кф-Пр (рис. 9). Число смесей в обучающих выборках меняли от 3 до 9. Приведены модули погрешностей определения разных веществ, усредненные по результатам анализа 11 тестовых смесей.

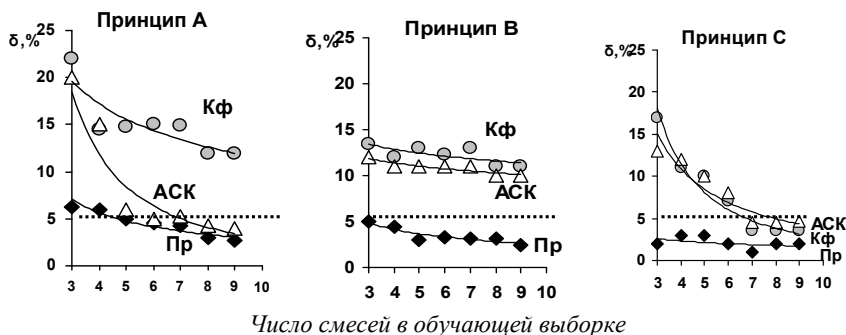


Рис. 9. Средние погрешности определения АСК, Кф и Пр в тестовых смесях в зависимости от принципа формирования обучающей выборки и ее объема

Во всех случаях погрешности анализа снижаются по мере увеличения объема выборок и, как правило, нелинейно. Результаты, полученные для разных компонентов, различны. Так, Пр определяется хорошо по всем градуировкам, но наименьшие погрешности достигаются по градуировке типа С. Другие компоненты (АСК и Кф) определяются с погрешностью не более 5% отн. лишь по градуировке типа С, когда обучающая выборка состоит не менее чем из 7 смесей. Дальнейшее увеличение объема выборки уже практически не влияет на результат.

Для других смесей лекарственных веществ и витаминов градуировки строили, формируя выборки уже только по принципу С. Во всех случаях погрешности определения аналитов зависят от объема обучающей выборки, эта зависимость хорошо воспроизводится и имеет одинаковый характер для разных компонентов одной и той же смеси. А именно, с ростом N погрешности определения любого компонента вначале резко снижаются, а затем перестают меняться. На рис. 10 показаны зависимости вида $\xi = f(N)$ для систем с разным числом аналитов, от 2-х до 6-ти.

Положение излома зависит от числа одновременно определяемых аналитов. Так, при одновременном определении 3 компонентов смеси в обучающую выборку достаточно включить 7 модельных смесей, для определения 4 компонентов – 9 смесей, и т.п. Дальнейшее увеличение объема выборки не меняет точности анализа смеси, а, следовательно, – нецелесообразно. Обобщая полученные данные, можно сделать вывод, что объем обучающей выборки (N^*), необходимый и достаточный для минимизации погрешности анализа смеси по методу ПЛС, связан с числом определяемых компонентов (m) по формуле:

$$N^* = 2m + 1. \quad (36)$$

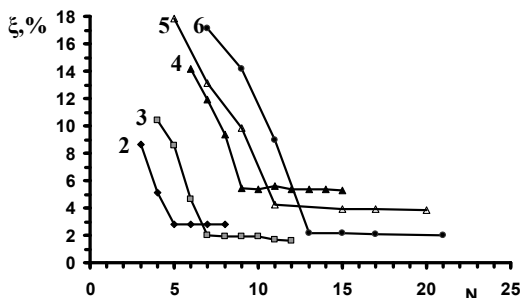


Рис. 10. Зависимость обобщенной погрешности анализа тестовых смесей от объема обучающей выборки, N . Цифрами указано число определяемых компонентов

Данная закономерность ранее в литературе не описана, по-видимому, она установлена впервые. В случае метода МЛР-2 зависимости обобщенной погрешности от объема градуировочного набора имеют аналогичный характер (за исключением бинарных систем, см. рис.6 и рис.9). Принципиальное отличие в формировании обучающих выборок ПЛС и градуировочных наборов МЛР заключается в том, что в методе ПЛС обязательным условием является включение в состав выборки смеси номинального состава. В методе МЛР, наоборот, включение такой смеси нежелательно, т.к. ухудшается точность оценки регрессионных коэффициентов, что влечет за собой ухудшение результатов анализа.

С учетом формулы (36), была разработана *схема формирования оптимальной обучающей выборки для метода ПЛС*. Такая выборка должна состоять из $2m + 1$ модельной смеси и включать смесь номинального состава, определяющей, по аналогии с полным факторным экспериментом (ПФЭ), центр плана. Оставшиеся $2m$ смеси отбирают из всех возможных сочетаний концентраций компонентов (факторов), взятых на уровне выше (+) и ниже номинального (-), при этом число отобранных смесей должно быть примерно пропорционально числу возможных комбинаций факторов (табл. 16). Каждый фактор должен встречаться на верхнем и нижнем уровнях одинаково часто, поскольку отличия от номинального состава в реальных объектах носят случайный характер, а значит, появление положительных и отрицательных отклонений равновероятно. Включать в выборки смеси, где все факторы находятся на одном и том же уровне (верхнем или нижнем) не желательно: соотношение компонентов в этих смесях будет таким же, как и в смеси номинального состава, уже включенной в выборку. Интервалы варьирования задаются, исходя из возможных или допустимых отклонений в содержаниях компонентов от номинального состава, и по разным факторам могут не совпадать. Если в состав анализируемых проб будут входить некоторые неопределяемые компоненты, по-

глощающие в той же области спектра, что и аналиты, их необходимо вводить в смеси обучающей выборки.

В табл. 16 приведены схемы формирования выборок для 3-, 4- и 6-компонентных смесей. Как видно, для трехкомпонентных смесей надо приготовить практически все смеси по плану ПФЭ (за исключением двух, в которых все факторы находятся на одном уровне, нижнем и верхнем). В остальных случаях можно ограничиться гораздо меньшим числом смесей, чем 2^n . Так, для 6-компонентной смеси из 64-х возможных комбинаций сочетания аналитов достаточно отобрать по предложенной схеме всего 12.

Таблица 16

**Схема формирования обучающих выборок
для смесей с разным числом аналитов**

Число факторов (аналитов)	3		4			6				
Число факторов на верхнем уровне (+)	1	2	1	2	3	1	2	3	4	5
Число факторов на нижнем уровне (-)	2	1	3	2	1	5	4	3	2	1
Число комбинаций факторов	3	3	4	6	4	6	15	20	15	6
Из них включены в обучающую выборку	3	3	2	4	2	1	3	4	3	1
Итого смесей	6+1		8+1			12+1				

В качестве примера в табл. 17 приведена одна из возможных комбинаций факторов при формировании обучающей выборки для 6-компонентной смеси витаминов. Составы смесей № 2-7 симметричны составам смесей № 8-13 (попарно, например, смеси 2 и 8, 3 и 9 и т.п.). Это упрощает выполнение условия нахождения каждого фактора на нижнем и верхнем уровнях одинаковое число раз.

Таблица 17

**Пример комбинации факторов в обучающей выборке
для 6-компонентной смеси витаминов**

Витамин	Смесь, №												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
В ₁	Номинальная смесь	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
В ₂		-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
В ₃		-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
В ₅		-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
В ₆		-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
К ₃		-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+

Составленные по данной схеме обучающие выборки были применены для построения многомерных ПЛС-градуировок. Анализировали как

аддитивные, так и неаддитивные смеси, содержащие от 2 до 6 анализов. Несмотря на относительно небольшой объем обучающих выборок, построенные модели позволяли определять компоненты смесей весьма точно. Так, для анализа трехкомпонентных аддитивных смесей АСК-Кф-Пр, имеющих различные соотношения компонентов, такие же, как в препаратах «Кофицил» и «Цитрамон», были построены разные градуировки. Результаты, анализа модельных смесей методами ПЛС и МЛР-2 приведены в табл. 18.

Таблица 18

Метрологические характеристики методик определения АСК-Кф-Пр в модельных смесях методами МЛР-2 и ПЛС

Модель	Ана-лит	Диапазон определяемых концентраций, мкг/мл	ПЛС		МЛР-2	
			$\delta \%$	σ_r	$\delta \%$	σ_r
«Кофицил»	АСК	11,0 – 18,0	< 3	0,029	< 1	0,018
	Кф	1,7 – 3,0	< 1	0,010	< 1	0,011
	Пр	3,5 – 6,0	< 2	0,021	< 3	0,037
«Цитрамон»	АСК	6,6 – 11	< 4	0,014	< 3	0,015
	Кф	0,80 – 1,5	< 5	0,036	< 2	0,017
	Пр	5,0 – 8,3	< 4	0,017	< 2	0,013

Видно, что оба метода позволяют определять все анализы с одинаковой точностью. Приведем также в качестве примера метрологические характеристики методики определения витаминов, с помощью которой были проанализированы 20 однотипных 6-компонентных смесей (табл. 19).

Таблица 19

Метрологические характеристики методики определения витаминов в однотипных 6 -компонентных модельных смесях методом ПЛС

Витамин	Диапазон определяемых концентраций, мкг/мл	ПЛС		МЛР-2	
		$\delta \%$	σ_r	$\delta \%$	σ_r
B ₁	0,60 – 1,0	< 5	0,005	< 10	0,005
B ₂	2,0 – 3,0	< 1	0,005	< 2	0,018
B ₃	3,0 – 5,0	< 2	0,010	< 6	0,020
B ₅	12,0 - 20,0	< 1	0,088	< 1	0,068
B ₆	0,90 - 1,5	< 2	0,005	< 2	0,005
K ₃	0,60 – 1,0	< 2	0,005	< 2	0,005

Сравнение результатов анализа одних и тех же смесей, выполненные методами МЛР-2 и ПЛС, позволяют рекомендовать первый из них к

анализу 2-5-компонентных смесей при условии примерно одинаковых вкладов компонентов в оптическую плотность смеси. Для анализа более сложных по составу смесей, а также когда светопоглощение компонентов очень сильно отличается, лучшие результаты дает использование метода ПЛС. Особенно заметно различие результатов по слабо поглощающим витаминам В₁ и В₃. Точность определения остальных витаминов была примерно одинаковой. Дополнительным преимуществом ПЛС по сравнению с методом МЛР является то, что определение всех анализов возможно в одном спектральном диапазоне, без его дополнительной оптимизации, независимо от аддитивности, вкладов отдельных компонентов в светопоглощение смесей, а также наличия посторонних веществ. Это существенно сокращает время не только на этапе разработки методики, но и в ходе проведения анализа.

Анализ реальных объектов

На основании изученных алгоритмов были разработаны экспрессные спектрофотометрические методики анализа лекарственных и витаминных препаратов, а также витаминных добавок – премиксов. В табл. 20 приведены названия препаратов и указаны хеометрические алгоритмы, использованные в методиках.

Таблица 20

Перечень объектов, для которых разработаны методики спектрофотометрического анализа с применением хеометрических алгоритмов

Число определяемых анализов	Алгоритм расчета содержаний	Препарат
2	МФ*	«Солпадеин», «Тетралгин», «Панадол-ЭКСТРА»
	МФ*, МЛР-2	«Папазол», «Анальгин-хинин»
3	МЛР-2	«Аскофен», «Кофицил», «Цитрамон»
4	МЛР-2, ПЛС	«Андипал»
5	МЛР-2, ПЛС	«Ундевит»
5-6	ПЛС	Премиксы к кормам птиц

* – расчеты ведут с использованием трех наборов АДВ.

Анализ лекарственных и витаминных препаратов. На примере таких препаратов, как «Анальгин-хинин», «Тетралгин» и «Папазол» показано, что использование многоволновой спектрофотометрии (МЛР-2 или МФ с использованием трех наборов АДВ) приводит к снижению погрешности определения компонентов, а в некоторых случаях – к достоверному улучшению воспроизводимости, по сравнению с классическим вариантом МФ, когда расчет ведут на одном наборе АДВ. В качестве примера в

табл. 21 представлены результаты количественного определения активных компонентов препарата «Папазол-УБФ», выполненные по нескольким методикам: методике фармакопейной статьи (ФС 42-1869-82), с применением классического варианта МФ, и по двум разработанным методикам –МФ с использованием трех наборов АДВ, выбранных по предложенному критерию, и методом МЛР-2. Результаты, полученные по разработанным методикам, и по методике ФС совпадают (различие средних значений статистически не значимо: $t_{ПГ} = 0,14$; $t_{Дб} = 0,03$; $t_{табл} = 4,30$).

Таблица 21

Результаты количественного определения папаверина гидрохлорида и дибазола в препарате «Папазол-УБФ» по разным методикам (n = 3, P = 0,95)

Методика	масса, г	
	ПГ	Дб
ФС 42-1869-82	$0,029 \pm 0,003$	$0,030 \pm 0,001$
МФ (1 набор АДВ)	$0,026 \pm 0,001$	$0,036 \pm 0,001$
МФ (3 набора АДВ)	$0,030 \pm 0,001$	$0,030 \pm 0,001$
МЛР-2	$0,029 \pm 0,004$	$0,031 \pm 0,001$
<i>допустимые пределы, г</i>	<i>0,027 – 0,033</i>	<i>0,027 – 0,033</i>

Правильность определения оценивали методом «введено-найдено» (табл. 22). Как видно, предлагаемые методики не уступают по точности аттестованной методике ФС, в отличие от классического варианта МФ, когда добавка Дб определяется с большой систематической погрешностью. По продолжительности разработанные методики являются экспрессными, на анализ требуется не более 30 мин, вместо 60 мин по методике ФС.

Таблица 22

Проверка правильности определения активных компонентов препарата «Папазол»

Методика	ПГ, введено 470 мкг			Дб, введено 470 мкг		
	Найдено, мкг	δ , %	Sr	Найдено, мкг	δ , %	Sr
ФС 42-1869-82	467	-0,5	0,010	475	1,2	0,004
МФ (1 набор АДВ)	452	-3,8	0,010	545	16	0,040
МФ (3 набора АДВ)	466	-0,8	0,013	471	0,3	0,005
МЛР-2	464	-1,4	0,033	468	-0,5	0,013

Анализ более сложных по составу препаратов выполняли методами МЛР-2 и ПЛС. В табл. 23 приведены результаты анализа лекарственных и витаминных препаратов на содержание 3–5 активных компонентов.

Таблица 23

Результаты анализа препаратов методами МЛР-2 и ПЛС

Препарат	Компонент	Указано на упаковке, мг	Допустимые пределы, мг	Найдено, мг/табл	
				МЛР-2	ПЛС
«Цитрамон»	АСК	240	228 - 262	227,4 ± 6,0	224,4 ± 4,6
	Кф	30	27 - 33	29,8 ± 3,3	28,0 ± 1,8
	Пр	180	171 - 189	163,3 ± 3,3	165,3 ± 2,3
«Андипал»	Ан	250	237 - 263	250,0 ± 1,0	255,0 ± 1,0
	ПГ	20	18 - 22	19,3 ± 0,3	19,8 ± 0,2
	Дб	20	18 - 22	19,9 ± 0,2	19,5 ± 0,2
	Фб	20	18 - 22	18,7 ± 0,6	19,6 ± 0,5
«Ундевит»	В ₁	2	1,8 - 2,2	1,8 ± 0,3	1,8 ± 0,1
	В ₂	2	1,8 - 2,2	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1
	В ₅	20	18 - 22	19,7 ± 0,5	19,0 ± 0,2
	В ₆	3	2,7 - 3,3	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,2
	С	75	67 - 83	77,0 ± 3,0	73,0 ± 2,0

Расхождения с указанными на упаковках массами компонентов практически во всех случаях не превышают допустимых значений (10 % отн.). Результаты проверки правильности представлены в табл. 24. Жирным шрифтом выделены значения S_r и $\delta, \%$ тех выборок, где выявлены достоверные различия в сходимости (по критерию Фишера) и/или средних значений (по критерию Стьюдента). Как видно, применение метода ПЛС позволяет достоверно снизить погрешности определения трех компонентов препарата «Андипал», и повысить сходимость результатов определения витамина В₅ в препарате «Ундевит».

Таблица 24

Проверка правильности определения активных компонентов (n=6)

Препарат	Компонент	Введено, мкг	Найдено, мкг		$\delta, \%$		S_r	
			МЛР-2	ПЛС	МЛР-2	ПЛС	МЛР-2	ПЛС
«Цитрамон»	АСК	90,3	90,0	93,1	-0,3	3,1	0,014	0,019
	Кф	11,1	10,8	10,6	-2,7	-4,5	0,026	0,010
	Пр	62,4	65,1	60,9	4,3	-2,4	0,025	0,007
«Андипал»	Ан	125,0	122,8	125,9	-1,8	0,7	0,012	0,003
	ПГ	10,0	9,3	10,2	-7,0	2,0	0,030	0,008
	Дб	10,0	9,4	9,8	-6,0	-2,0	0,034	0,004
	Фб	10,0	10,2	10,3	2,0	3,0	0,020	0,016
«Ундевит»	В ₁	10,0	9,8	9,6	-2,1	-3,8	0,043	0,029
	В ₂	10,0	9,9	10,3	-1,2	2,5	0,052	0,017
	В ₅	150,0	148,3	145,3	-1,1	-3,1	0,025	0,005
	В ₆	15,0	14,7	15,4	-1,4	2,9	0,014	0,013
	С	500,0	503,4	487,9	0,7	-2,4	0,022	0,017

Построенные ПЛС-градуировки и вычисленные для МЛР-2 коэффициенты могут применяться к анализу препаратов в течение длительного времени. В настоящей работе они использовались без дополнительной корректировки более года.

Две методики прошли официальную метрологическую аттестацию в Томском политехническом университете и в настоящее время зарегистрированы в Федеральном реестре методик измерений. Это «Методика выполнения измерений содержания папаверина гидрохлорида и дибазола в лекарственном препарате спектрофотометрическим методом» (рег. код по реестру ФР.1.31.2010.07919), основанная на применении метода МЛР-2, и «Методика выполнения измерений содержания ацетилсалициловой кислоты, кофеина и парацетамола в лекарственном препарате «Кофицил» спектрофотометрическим методом» (рег. код по реестру ФР.1.31.2010.07920), основанная на применении метода ПЛС. Разработанные методики позволяют вести одновременное определение активных компонентов лекарственных препаратов с погрешностью, не превышающей 5 %, как того требует Государственная Фармакопея. Метрологические характеристики методик представлены соответственно в табл. 25 и 26.

Таблица 25

Метрологические характеристики методики выполнения измерений содержания компонентов препарата «Папазол» (P = 0,95)

Определяемый компонент	Диапазон содержаний, мг/табл	Показатель повторяемости σ_r , %	Показатель воспроизводимости σ_R , %	Показатель точности, δ , %
Дб	От 20 до 40	2,0	3,0	7,0
Пг	От 20 до 40	1,5	2,0	6,0

Таблица 26

Метрологические характеристики методики выполнения измерений содержания компонентов препарата «Кофицил-плюс» (P = 0,95)

Определяемый компонент	Диапазон содержаний, мг/табл	Показатель повторяемости σ_r , %	Показатель воспроизводимости σ_R , %	Показатель точности δ , %
АСК	От 250 до 500 включ.	1,0	3,0	7,0
Кф	От 40 до 80 включ.	2,0	3,0	7,0
Пр	От 80 до 150 включ.	1,0	5,0	10,0

Анализ премиксов. Премиксы являются витаминно-минеральными добавками к кормам птиц и животных, и представляют собой однородные смеси наполнителей, витаминов, минеральных и органических добавок. Наполнителями являются мел, отруби, цеолиты и другие материалы. В премиксах одновременно может содержаться до 12 витаминов, 5–6 видов минеральных солей, аминокислоты и другие компоненты. Такой сложный

состав делает анализ премиксов на содержание водорастворимых витаминов весьма непростой задачей. Наборы витаминов во всех этих премиксах примерно одинаковы по качественному составу, но различаются по относительному содержанию разных витаминов. Например, к макрокомпонентам можно отнести витамин В₅, к микрокомпонентам – В₁ и К₃. В настоящее время определение витаминов в премиксах ведут по ГОСТу 50929-96 методом ВЭЖХ. Однако методика, изложенная в данном ГОСТе, позволяет определять только три витамина – В₁, В₂ и В₅.

Нами разработаны методики анализа премиксов, включающие извлечение из премиксов суммы водорастворимых витаминов 0,01 М НСl и анализ полученных экстрактов спектрофотометрическим методом с применением алгоритмов ПЛС и МЛР-2. На этапе пробоподготовки методика требует меньших затрат времени и гораздо проще, чем известные методики извлечения витаминов из премиксов. Для учета влияния других компонентов премиксов были сняты спектры экстрактов минеральных премиксов, в состав которых витамины не входили, а по остальным компонентам составы минеральных и витаминно-минеральных премиксов совпадали. Затем из спектров витаминно-минеральных премиксов вычитали спектры минеральных премиксов, получая таким образом «исправленный» спектр, который и обрабатывали методами МЛР-2 и ПЛС. Спектрофотометрическая методика позволяет определять в премиксах до 6 витаминов, так же как и методика ВЭЖХ, которая прошла межлабораторный контроль и в настоящее время серийно используется в ГНУ СибНИИП Россельхозакадемии.

Приведем результаты анализа премикса на отрубях. Как видно, результаты анализа, полученные методами СФ- и ВЭЖХ-анализа, практически совпадают (табл. 27). Сравнение средних значений, выполненное по критерию Стьюдента, указывает на статистическую незначимость различий для всех витаминов. Для витамина В₆ переход к ПЛС обеспечивает достоверное повышение сходимости результатов по сравнению с хроматографической методикой, для остальных витаминов сходимость обеих методик одинакова.

Спектрофотометрический анализ премиксов на содержание водорастворимых витаминов методами МЛР-2 и ПЛС является более экономичным, экспрессным и в ряде случаев может использоваться вместо ВЭЖХ. Несмотря на то, что для каждого соотношения витаминов в премиксах необходимо строить собственную ПЛС-градуировку, метод может служить альтернативой и дополнением методу ВЭЖХ. В тех случаях, когда необходимое программное обеспечение отсутствует, метод ПЛС может быть заменен использованием другого хеометрического алгоритма – метода МЛР в варианте непрямой градуировки. Спектрофотометрическое окончание анализа премиксов с использованием хеометрических алгоритмов может быть рекомендовано для массового (рутинного) анализа однотипных премиксов, в частности для экспрессного технологического контроля качества премиксов в процессе их производства. Напротив, хроматографическое определение

может быть рекомендовано тем лабораториям, которые проводят разовые анализы премиксов, существенно различающихся по своему составу.

Таблица 27

**Результаты анализа премикса на отрубях
методами спектрофотометрии и ВЭЖХ**

Витамин	Содержание по рецептуре, мг/г	Найдено, мг/г		
		СФ (МЛР- 2)	СФ (ПЛС)	ВЭЖХ
B ₁	1,2	1,4 ± 0,6	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,3
B ₂	4,0	3,8 ± 1,3	4,1 ± 0,4	3,4 ± 0,7
B ₃	6,0	5,5 ± 1,7	6,2 ± 0,6	6,1 ± 0,2
B ₅	24,0	23 ± 4	21 ± 4	22 ± 3
B ₆	2,0	2,0 ± 0,4	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,9
K ₃	2,0	1,7 ± 0,1	2,0 ± 0,2	-

Общее заключение по работе

Спектрофотометрический анализ в сочетании с хеометрическими алгоритмами позволяет определять органические вещества по их собственному светопоглощению в смесях без разделения при полном наложении спектров и при наличии отклонений от аддитивности. В зависимости от сложности состава (число определяемых компонентов, наличие посторонних светопоглощающих компонентов, различные вклады компонентов в светопоглощение смеси) и степени неаддитивности светопоглощения целесообразно применение одного из алгоритмов – МФ, МЛР и ПЛС.

Метод Фиророта может быть применен к анализу относительно несложных, 2-3-компонентных смесей, в том числе неаддитивных, при условии, что отклонения от аддитивности не превышают своих допустимых значений, которые можно оценить с помощью предложенных в работе алгоритмов. Доказано, что при изменении соотношения компонентов в смеси меняются и наборы АДВ, и данный фактор необходимо учитывать при выборе АДВ. Для снижения влияния неаддитивности на точность анализа предложен новый критерий для выбора АДВ.

Метод МЛР-1 с применением коэффициентов поглощения индивидуальных соединений дает весьма хорошие результаты при анализе бинарных смесей, независимо от их аддитивности (возможно равноточное определение компонентов при 5-6-кратном избытке одного из них), а также при анализе аддитивных 3-4-компонентных смесей. В 6-компонентных смесях точно определить содержания всех компонентов методом МЛР не удастся. Оптимизация спектральных диапазонов требуется всегда, независимо от числа аналитов, а также от того, аддитивным или неаддитивным является светопоглощение смеси. Это увеличивает время на поиск оптимальных условий анализа, однако не всегда приводит к желаемой точности результатов.

Переход к методу МЛР-2 позволяет расширить границы применимости МЛР, а именно - анализировать смеси, в которых соотношение ком-

понентов меняется в более широком интервале, например, для бинарных систем от 10:1 до 1:10 и более; одновременно определять от 2 до 5-6 аналитов, независимо от аддитивности светопоглощения; учесть присутствие других поглощающих компонентов смесей; без дополнительной оптимизации диапазонов анализировать смеси, содержащие до 4-5 компонентов, при условии, что вклады компонентов в оптическую плотность соизмеримы. При необходимости с целью снижения погрешностей можно, во-первых, проводить оптимизацию спектральных диапазонов, во-вторых, формировать градуировочные наборы для вычисления коэффициентов по специальным планам. Вычисленные коэффициенты могут применяться и в расчетах по методу Фирордта.

При усложнении составов наиболее точные результаты обеспечивает применение *метода ПЛС*. С его помощью удастся правильно определить содержание до 6 аналитов, независимо от аддитивности светопоглощения, вкладов отдельных компонентов в оптическую плотность смеси и наличия посторонних веществ. Особое внимание следует уделять принципу формирования обучающих выборок. Для смесей, имеющих номинальный состав, необходимо формировать выборки с учетом такого состава и обязательным включением его в обучающую выборку. Разработанный принцип составления обучающих выборок позволяет ограничить их число и получить градуировочную модель всего за один рабочий день. В дальнейшем применение построенных градуировок и расчет по ним содержания аналитов занимает не более 10-15 минут.

Спектрофотометрический анализ с применением алгоритмов МФ, МЛР-2 и ПЛС делает возможным одновременное определение компонентов даже в тех случаях, когда содержание одного из них в 6-30 раз меньше, чем содержания других компонентов. Разработанные экспрессные методики СФ-анализа лекарственных препаратов позволяют вести определение активных компонентов с погрешностью, не превышающей 5%, как того требует Государственная Фармакопея. Методика СФ-анализа витаминных добавок - премиксов по точности не уступает методике с применением ВЭЖХ.

Выводы.

1. Доказано, что метод Фирордта может быть применен к спектрофотометрическому анализу неразделенных смесей даже при наличии в их спектрах поглощения статистически значимых отклонений от аддитивности. Предложены и проверены расчетные алгоритмы для оценки систематических погрешностей метода Фирордта, а также предельного уровня допустимых отклонений от аддитивности, при котором возможно определение компонентов смеси на одном наборе длин волн с погрешностями, не превышающими заданный предел.

2. Для оптимизации анализа смесей по методу Фирордта предложен и программно реализован способ выбора аналитических длин волн (АДВ), учитывающий ряд факторов, в том числе отклонения от аддитивности.

Результаты определения компонентов на разных наборах длин волн, отобранных по предложенному способу, слабо коррелированы, что позволяет рассматривать их как независимые и усреднять результаты, полученные на нескольких наборах АДВ. Это уменьшает влияние случайных погрешностей и повышает точность анализа.

3. Использование метода МЛР в анализе 2-6-компонентных смесей лекарственных веществ и витаминов при достаточно большом объеме спектральных данных приводит к погрешностям порядка 5–20 % отн. в варианте прямой градуировки и 1-5% отн. в варианте не прямой градуировки. Для повышения точности рекомендуется выбирать спектральные интервалы и использовать для вычисления коэффициентов градуировочные наборы, содержащие от m до $2m$ модельных смесей (m – число аналитов).

4. С целью оптимизации условий анализа смесей методом МЛР в варианте не прямой градуировки предложен, теоретически обоснован и программно реализован новый способ формирования градуировочных наборов для вычисления регрессионных коэффициентов. Использование этого способа, основанного на минимизации функционала погрешностей, позволяет в случае неаддитивных смесей достоверно снизить систематические погрешности результатов анализа.

5. В спектрофотометрическом анализе смесей с применением метода проекции на латентные структуры (ПЛС) способ формирования обучающих выборок (ОВ) влияет на точность определения компонентов. Обучающие выборки желательно формировать с учетом номинального состава объектов анализа, обязательно включая в ОВ смесь номинального состава. Впервые установлено, что в спектрофотометрическом анализе смесей с известным номинальным составом для определения m компонентов методом ПЛС достаточно использовать обучающую выборку, содержащую $2m + 1$ модельных смесей. Дальнейшее увеличение числа модельных смесей в ОВ не приводит к достоверному снижению погрешностей определения аналитов.

6. Использование спектрофотометрии в сочетании с методом ПЛС позволяет с той же точностью анализировать более сложные по составу смеси, чем методами МФ и МЛР. Метод ПЛС устойчив к отклонениям от аддитивности и не требует дополнительной оптимизации спектральных диапазонов. В оптимальных случаях погрешности определения аналитов даже в 5-6-компонентных смесях могут составлять 1-2 % отн.

7. С использованием вариантов МФ, МЛР-2 и ПЛС разработаны и метрологически аттестованы экспрессные методики спектрофотометрического анализа лекарственных и витаминных препаратов, содержащих от двух до шести одновременно определяемых активных компонентов. Эти методики характеризуются незначимыми систематическими погрешностями (порядка 3-5 % отн.), не уступают по точности хроматографическим, и могут быть использованы в контрольно-аналитических лабораториях.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах

1. Власова И.В., Шилова А.В., Кулакова С.А. Спектрофотометрическое определение кофеина, парацетамола и ацетилсалициловой кислоты при совместном присутствии // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. – 2005. – Т. 71. – № 9. – С. 18–20.
2. Власова И.В., Шилова А.В., Одинец Е.Н., Рыжова С.В. Спектрофотометрическое определение папаверина гидрохлорида и дибазола в лекарственном препарате «Папазол» // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов (Пятигорская государственная фармацевтическая академия). – Вып. 60. – Пятигорск, 2005. – С. 193–194.
3. Власова И.В., Шилова А.В. Критерий выбора аналитических длин волн при анализе двухкомпонентных смесей с малым содержанием одного из компонентов // Всероссийская конференция «Менделеевские чтения». Труды конференции. Тюмень. – 2005. – С. 427–430.
4. Власова И.В., Шилова А.В. Повышение точности определения компонентов в двухкомпонентных смесях по методу Фирордта // Вестник Омского университета. – 2006. – № 3. – С. 53–55.
5. Власова И.В., Шилова А.В. Новые подходы к спектрофотометрическому анализу многокомпонентных смесей // Вісник Харківського Національного Університету. – 2007. – № 770. – Хімія. – Вип. 15(38). – С. 141–146.
6. Власова И.В., Шилова А.В., Фокина Ю.С. Спектрофотометрическое определение активных компонентов в составе лекарственных препаратов с использованием метода Фирордта. Анализ препаратов «Анальгин-хинин» и «Панадол-ЭКСТРА» // Хим.-фарм. журнал. – 2008. – Т. 42. – № 10. – С. 49–53.
7. Власова И.В., Шилова А.В., Фокина Ю.С. Спектрофотометрическое определение активных компонентов в составе лекарственных препаратов с использованием метода Фирордта. Анализ препаратов «Тетралгин» и «Солпадеин» // Хим.-фарм. журнал. – 2008. – Т. 42. – № 11. – С. 53–56.
8. Богданова Л.А., Масыкова Е.Н., Пермякова Н.Ю., Власова И.В. Хроматографическое определение водорастворимых витаминов в премиксах // Вестник Омского университета. – 2007. – № 1. – С. 26–29.
9. Власова, И.В. Масыкова Е.Н, Богданова Л.А, Пермякова Н.Ю. Определение водорастворимых витаминов в премиксах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. – 2007. – Т. 73. – № 9. – С. 25–27.
10. Масыкова Е.Н., Шелпакова А.С., Феллер А.В., Власова И.В. Определение водорастворимых витаминов группы В в неразделенных смесях // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. тр. / Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – Вып. 63. – Пятигорск, 2008. – С. 303–304.
11. Власова И.В., Шелпакова А.С., Масыкова Е.Н. Спектрофотометрический анализ смесей витаминов с применением метода множественной линейной регрессии // Аналитика и контроль. – 2009. – Т. 13. – № 2. – С. 86–90.
12. Власова И.В., Шелпакова А.С., Добровольский С.М., Фисенко А.В. Новые подходы к применению метода множественной линейной регрессии в спектрофотометрическом анализе многокомпонентных смесей // Аналитика и контроль. – 2009. – Т. 14. – № 3. – С. 153–157.

13. Власова И.В., Вершинин В.И. Возможность определения компонентов бинарных смесей методом Фирордта с погрешностями, не превышающими заданный предел // Журн. аналит. химии. – 2009. – Т. 64. – № 6. – С. 571–576.
14. Власова И.В., Масыкова Е.Н., Корягина А.Ю. Спектрофотометрическое определение витаминов в неразделенных смесях с применением метода проекции на латентные структуры (ПЛС) // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. – 2010. – Т. 76. – № 2. – С. 18–21.
15. Власова И.В., Исаченко Н.А., Шилова А.В. Предельно допустимые отклонения от аддитивности при фотометрическом анализе бинарных смесей методом Фирордта // Журн. аналит. химии. – 2010. – Т. 65. – № 5. – С. 481–487.
16. Власова И.В., Шелпакова А.С., Нагаев А.А. Формирование градуировочных наборов для спектрофотометрического анализа многокомпонентных смесей с применением метода множественной линейной регрессии // Вестник Омского университета. – 2010. – № 2. – С. 99–105.
17. Власова И.В., Вершинин В.И., Шелпакова А.С. Хемометрические алгоритмы в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей органических веществ // Вестник Омского университета. – 2010. – № 2. – С. 14–24.
18. Власова И.В., Вершинин В.И., Харькова М.А. Планирование эксперимента как способ изучения отклонений от аддитивности светопоглощения // Вестник Омского университета. – 2010. – № 2. – С. 91–98.
19. Власова И.В., Шилова А.В., Фокина Ю.С. Спектрофотометрические методы в анализе лекарственных препаратов (обзор) // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. – 2011. – Т. 77. – № 1. – С. 21–28.
20. Власова И.В., Вершинин В.И., Цюпко Т.Г. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Проблема неаддитивности светопоглощения // Журн. аналит. химии. – 2011. – Т. 66. – № 1. – С. 25–33.
21. Вершинин В.И., Власова И.В., Цюпко Т.Г. Выявление отклонений от аддитивности в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей // Методы и объекты химического анализа. – 2010. – Т. 5. – № 4. – С. 226–234.
22. Шелпакова А.С., Власова И.В., Масыкова Е.Н. Анализ витаминных смесей с применением разных вариантов множественной линейной регрессии // Вестник Омского университета. – 2010. – № 4. – С. 107–111.

Подписано в печать 12.04.2011. Формат бумаги 60х84 1/16.
Печ. л. 3,25. Тираж 150 экз. Заказ 161.

Издательство ОмГУ
644077, Омск-77, пр. Мира, 55а
Отпечатано на полиграфической базе ОмГУ
644077, Омск-77, пр. Мира, 55а