

УДК 615.4

DOI 10.24412/2312-2935-2024-5-47-58

## МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ ПРИ КАЛИБРОВКЕ ВЭЖХ НА ПРИМЕРЕ КОФЕИНА

*О.А. Мельникова, А.В. Дедюхина, М.Ю. Мельников*

*ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург*

**Введение.** При разработке новых лекарственных форм одной из важных компетенций является анализ лекарственных веществ в данной форме. Для анализа используются приборы. Калибровка прибора – это установление зависимости между показаниями прибора и размером измеряемой величины. Калибровка прибора тесно связана с оценкой неопределённости результатов измерений.

Для определения неопределённости (неопределённости измерений) при калибровке прибора используется систематический процесс, который включает несколько этапов, таких как сбор данных, анализ данных, и вычисление различных видов неопределённости. В методиках для этого обычно применяют статистические методы.

**Целью** данной статьи является разработка методики калибровки прибора ВЭЖХ, обработка результатов измерений и оценка неопределённости в хроматографическом анализе лекарственных препаратов на примере стандартного образца кофеина.

**Материалы и методы исследования.** В качестве материалов и методов исследования использовался прибор ВЭЖХ марки Shimadzu Prominence-i SPD-M30A со спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей и стандартный образец кофеина фирмы Chemical Line партия: СВ-210725 годен до 31.05.2026

**Результаты.** Процесс калибровки включал проверку состояния прибора, его очистку и установку в рабочее положение. Для калибровки прибора по стандартному образцу кофеина производились следующие операции: взятие навески стандартного образца кофеина, растворение в мерной колбе, доведение до точного объема, хроматографирование на системе ВЭЖХ. Рассчитанная неопределённость включала сумму неопределённостей: неопределённость обусловленную случайными факторами (фактор повторяемости), неопределённость, обусловленную построением и с использованием градуировочной характеристики, неопределённость отбора объема воды, неопределённость измерений мерной посуды, неопределённость, обусловленная взвешиванием навески вещества.

**Выводы.** В результате исследования была получена методика определения неопределённости при калибровке прибора методом ВЭЖХ на примере стандартного образца кофеина. Рассчитан бюджет неопределённости, который не превышает неопределённость методики.

**Ключевые слова:** калибровка прибора, неопределённость средств измерений, ВЭЖХ, кофеин

## METHOD FOR DETERMINING UNCERTAINTY IN HPLC CALIBRATION USING THE EXAMPLE OF CAFFEINE

*Melnikova O.A., Dedyukhina A.V., Melnikov M.Yu.*

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ural State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ekaterinburg*

**Introduction.** When developing new dosage forms, one of the important competencies is the analysis of medicinal substances in this form. Instruments are used for analysis. Calibration of a device is the establishment of a relationship between the readings of the device and the size of the measured value. Instrument calibration is closely related to the assessment of the uncertainty of the measurement results.

To determine uncertainty (measurement uncertainty) in instrument calibration, a systematic process is used that involves several steps such as data collection, data analysis, and calculation of various types of uncertainty. Methods for this usually use statistical methods.

The purpose of this article is to develop a method for calibrating an HPLC instrument, processing measurement results and assessing uncertainty in the chromatographic analysis of drugs using the example of a standard sample of caffeine.

**Materials and methods of research.** The materials and research methods used were a Shimadzu Prominence-i SPD-M30A HPLC device with a spectrophotometric detector with a diode matrix and a standard sample of caffeine from Chemical Line, batch: SV-210725, valid until 05/31/2026

**Results.** The calibration process included checking the condition of the device, cleaning it and installing it in working position. To calibrate the device against a standard caffeine sample, the following operations were performed: taking a sample of a standard caffeine sample, dissolving in a volumetric flask, adjusting to an exact volume, and chromatography on an HPLC system. The calculated uncertainty included the sum of uncertainties: uncertainty due to random factors (repeatability factor), uncertainty due to the construction and use of the calibration characteristic, uncertainty in the selection of the volume of water, uncertainty in measuring glassware, uncertainty due to weighing a sample of the substance.

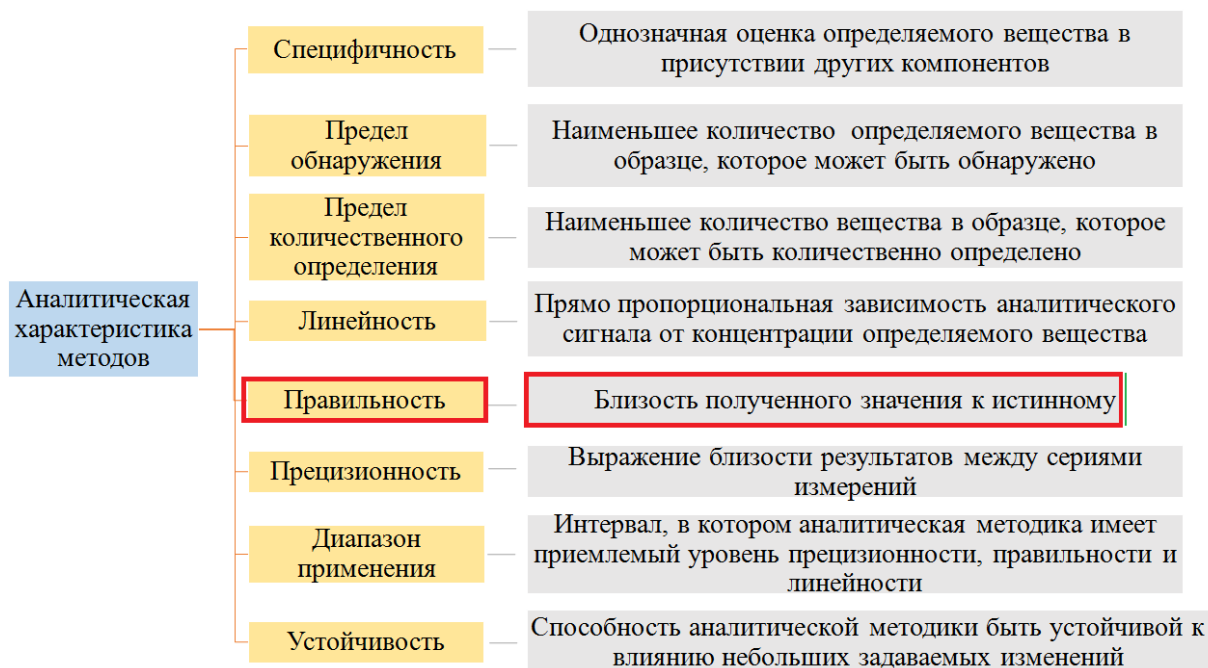
**Conclusions.** As a result of the study, a method was obtained for determining the uncertainty when calibrating a device using the HPLC method using a standard sample of caffeine as an example. An uncertainty budget has been calculated, which does not exceed the uncertainty of the methodology.

**Key words:** instrument calibration, uncertainty of measuring instruments, HPLC, caffeine

Невозможно представить свою жизнь без лекарственных препаратов. Новые технологии и медицинские открытия способствуют разнообразию ассортимента лекарственных средств, улучшая качество жизни и продлевая ее. Потребитель должен быть уверен в качестве принимаемого лекарственного препарата. Для оценки качества лекарственных препаратов существует множество фармакопейных методов. Результаты, полученные одним методом в разных лабораториях, в разные дни, разными людьми

должны давать одинаковые результаты. В связи с этим, при внедрении на производство аналитическая методика проходит процедуру валидации.

Процедуре валидации посвящено множество научных статей. В работе [1] проводили валидацию методики определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием изократического режима элюирования. В другом исследовании [2] валидировали методики контроля качества «цераксидол» раствора для инъекций, доказали правильность методики. Процедура валидации включает в себя оценку таких параметров как: специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость, сходимость, внутрилабораторная прецизионность, устойчивость, робастность) [Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. Общая фармакопейная статья (ОФС). OFC.1.1.0012 ].



**Рисунок 1.** Характеристики методики, используемые при её валидации

Одним из важнейших показателей в процедуре валидации является правильность получаемых значений [3]. Критерием оценки правильности является определение точности результатов, которое тесно связано с рассеянностью результатов измерения вокруг измеряемой величины [4].

*Актуальность исследования.* Расчет неопределенности в анализе лекарственного препарата имеет важное практическое значение, так как дает возможность оценить точность и достоверность полученных результатов анализа, исключить точки риска при проведении методики и соблюсти общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий [Распоряжение Правительства РФ от 19.04.2017 N 737-р «Об утверждении Стратегии обеспечения единства измерений в Российской Федерации до 2025 года»].

Для прохождения процедуры валидации прибор, на котором проводятся измерения должен быть калиброван. Калибровка используется в качестве инструмента для придания единства средств измерений [ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий (Переиздание)»]. Для проведения калибровки разрабатывается соответствующая методика принципы разработки которой описаны в [ГОСТ Р 8.879–2014. ГСИ. Методики калибровки средств измерений. Общие требования к содержанию и изложению]. Методика калибровки должна содержать расчет неопределенности результатов измерений при калибровке для обеспечения их метрологической прослеживаемости [ГОСТ ISO / IEC 17025–2019. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий]. Алгоритм обработки результатов измерений подробно описан в [РМГ 115–2019. ГСИ. Калибровка средств измерений. Алгоритмы обработки результатов измерений и оценивания неопределенности]. Алгоритмы обработки результатов индивидуальны для конкретной методики, что и обуславливает актуальность данного исследования.

*Целью данной работы* является разработка методики калибровки прибора ВЭЖХ, обработка результатов измерений и оценка неопределенности в хроматографическом анализе лекарственных препаратов на примере стандартного образца кофеина.

В качестве приборной базы использовали прибор ВЭЖХ Shimadzu Prominence с обращённо-фазовым режимом хроматографирования и условиями хроматографирования. Метрологические характеристики прибора представлены таблице 1.

В работе использовали хроматографическую колонку из нержавеющей стали размером 250 x 4,6 мм C18 YMC-Pack ODS A с размером частиц 5 мкм, в качестве подвижной фазы (ПФ), изократический, ПФА:ПФ Б (42:58), температура колонки 40 °С, скорость потока 1,0 мл/мин, детектор УФ, 214 нм, объем пробы 10 мкл, время анализа 40 минут. В качестве стандартного образца использовали стандартный образец кофеина фирмы Chemical Line партия: СВ-210725 годен до 31.05.2026.

**Таблица 1**

Метрологические характеристики прибора

<i>Параметр</i>	<i>Значение</i>
ВЭЖХ (марка)	Shimadzu Prominence-i SPD-M30A со спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей
Спектральный диапазон измерений	От 190 до 700 нм
Предел допускаемого значения относительного среднего квадратичного отклонения выходного сигнала, % по площади пиков	1,0
Предел допускаемого значения относительного среднего квадратичного отклонения выходного сигнала, % по времени удерживания	0,5
Пределы допускаемого значения относительного изменения выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы, %: - по площади пиков	±2,0
Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала, В, не более	$2 \cdot 10^{-5}$ ед.рефр./ч
Требуемая целевая неопределённость	0,1
Дрейф нулевого сигнала В/ч, не более	$1 \cdot 10^{-3}$ ед.рефр./ч
Предел детектирования по кофеину, не более	$3 \cdot 10^{-10}$ г/см <sup>3</sup>

В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил для хроматографии. Для калибровки прибора готовили рабочие растворы кофеина концентрациями: 0,016 мг/мл, 0,018 мг/мл, 0,020 мг/мл, 0,022 мг/мл, 0,024 мг/мл.

Для калибровки прибора по стандартному образцу [5] кофеина производились следующие операции: взятие навески стандартного образца кофеина, растворение в мерной колбе, доведение до точного объема, хроматографирование на системе ВЭЖХ.

Исходя из этой модели, неопределенность измеренной концентрации кофеина включает основные составляющие: неопределенность, обусловленную случайными факторами (фактор повторяемости), неопределенность, обусловленную построением и использованием градуировочной характеристики, неопределенность отбора объема воды, - неопределенность измерений мерной посуды, неопределенность, обусловленная взвешиванием навески вещества.

Оценка относительной стандартной неопределенности для концентрации кофеина по градуировочному графику проводили по формулам [6,7]:

$$u(C_0) = \frac{S}{k} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{m} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$$

$$S = \sqrt{\sum_{j=1}^n \frac{[A_j - (b + k \cdot c_j)]^2}{m - 2}}$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2$$

где,  $\bar{c}$  – среднее значение для концентрации градуировочных растворов;

$p$  – число измерений,  $m$  – количество объектов в выборке.

Величину  $A$  находят экспериментально, как результат средней выборки объема  $m$ , а метод её определения имеет метрологическую аттестацию.

$k$ -угловой коэффициент линейной зависимости,  $b$ -свободный коэффициент.

*Результаты и обсуждение.* В результате проведения опыта были получены хроматограммы, данные из которых представлены в таблице 2.

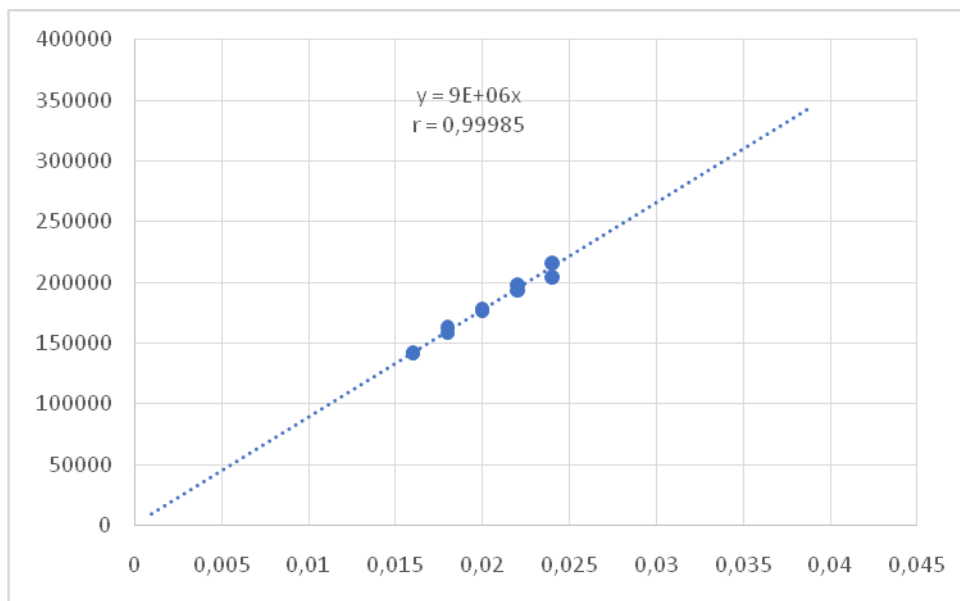
**Таблица 2**

Концентрация и площадь градуировочных растворов

№ серии растворов	$S$ пика кофеина (0,016 мг/мл)	$S$ пика кофеина (0,018 мг/мл)	$S$ пика кофеина (0,020 мг/мл)	$S$ пика кофеина (0,022 мг/мл)	$S$ пика кофеина (0,024 мг/мл)
1	142404	163013	178772	197949	216044
2	141522	158687	176526	193211	204225

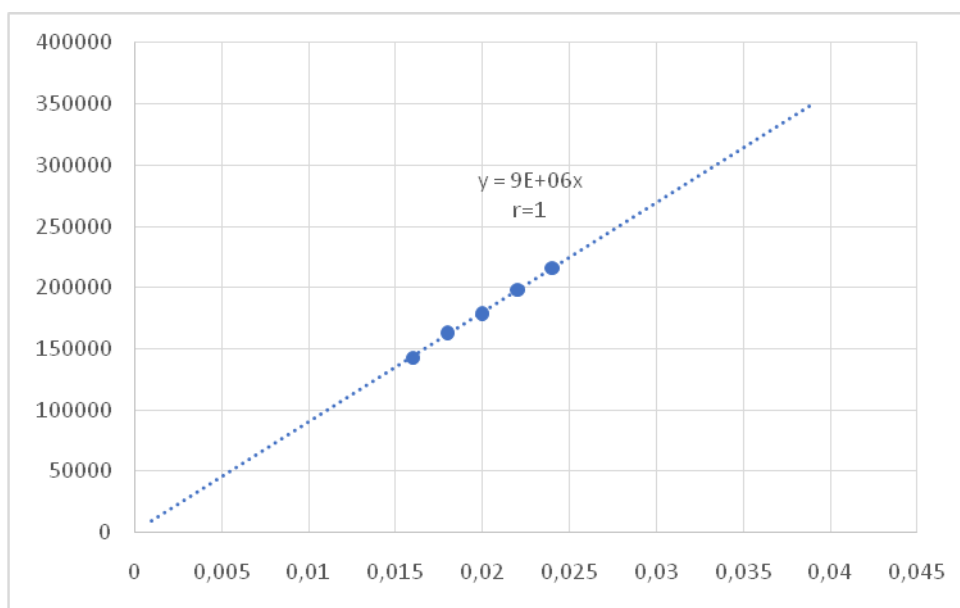
На основе данных построен градуировочный график и вычислена неопределенность концентрации кофеина в двух случаях:

- 1) для результатов двух измерений



**Рисунок 2.** График линейной зависимости для двух измерений

2) Для результатов единичного измерения, график также имел линейный вид.



**Рисунок 3.** График линейной зависимости для единичного измерения

Данные по расчету занесены в таблицу 3.

**Таблица 3**

Сводные данные

	<i>Параметр</i>	<i>k</i>	<i>b</i>	<i>S<sub>xx</sub></i>	<i>S</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>x<sub>0</sub></i>	<i>u<sub>(x,y)</sub></i>
Значение	Множественное измерение	8553650	6162,3	$8 \cdot 10^{-5}$	3596,56	2	10	0,02	$3,26 \cdot 10^{-4}$
	Единичное измерение	9110800	-2579,6	$4 \cdot 10^{-5}$	1145,11	1	5	0,02	$1,38 \cdot 10^{-4}$

*Оценка других составляющих неопределенности. Неопределенность объема воды.*

По данным производителя мерной стеклянной посуды ее калибруют при температуре 20°C, в то время как температура в лаборатории колеблется в пределах  $\pm t$  °C (например,  $20 \pm 5$  °C). Неопределенность, вызванную этим эффектом, можно вычислить исходя из указанного диапазона температур и коэффициента объемного расширения стекла и жидкости. Этот показатель для жидкостей существенно больше, чем для стекла, поэтому учитывают только объемное расширение жидкости [8,9]. Коэффициент объемного расширения воды и, следовательно, водных растворов равен  $\alpha = 2,1 \cdot 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ .

$$a = V \cdot \alpha \cdot \Delta t = 100 \cdot 2,1 \cdot 10^{-4} \cdot 5 = 0,105$$

Исходя из прямоугольного распределения вероятностей значений объема в указанном интервале, стандартная неопределенность  $u(V_t)$  равна:

$$u(V_t) = \frac{a}{\sqrt{3}} = \frac{0,105}{\sqrt{3}} = 0,061$$

Стандартная неопределенность  $u(V_k)$  вычисляется исходя из предположения о треугольном распределении вероятностей отклонений объемов от номинальных вместимостей в интервале, ограниченном пределами допускаемых погрешностей номинальной вместимости посуды, информацию о которых получают из свидетельств о калибровке, стандартов на мерную посуду или других источников. Отклонение объемов от номинальной вместимости лучше аппроксимировать треугольным распределением, чем прямоугольным, так как в реальном процессе ее производства номинальные значения объема более вероятны, чем крайние значения [10].

В данном случае для колбы 1-100-1 ГОСТ 1770-74 допустимая погрешность равна 0,1 мл, а стандартная неопределенность:



$$u(V_k) = \frac{a}{\sqrt{6}} = \frac{0,1}{\sqrt{6}} = 0,041$$

Неопределенность, которая связана с нахождением массы анализируемой навески оценивают, исходя из данных о погрешности весов, которые, как правило, приведены в свидетельстве о калибровке весов или документации производителя. Погрешность весов  $\Delta m = \pm 0,0005$  г.

Предполагая прямоугольный закон распределения погрешности весов, стандартная неопределенность массы равна:

$$u(m) = \frac{\Delta m}{\sqrt{3}} = \frac{0,0005}{\sqrt{3}} = 0,0003$$

Расчет суммарной стандартной неопределенности определяемой концентрации соединения в испытуемом растворе  $u(x_{изм.})$  осуществляется суммированием неопределенностей, оцененных исходя из указанных двух источников [146]:

$$u_x = \sqrt{u_{(x,y)}^2 + u_{(Vt)}^2 + u_{(V_k)}^2 + u_{(m)}^2}$$

**Таблица 4**

Бюджет неопределенности

	Параметр	$u_{(x,y)}$	$u_{(Vt)}$	$u_{(V_k)}$	$u_{(m)}$	$u_{(x)}$
Значение	Множественное измерение	$3,26 \cdot 10^{-4}$	0,061	0,041	$3 \cdot 10^{-4}$	0,0735
	Единичное измерение	$1,38 \cdot 10^{-4}$	0,061	0,041	$3 \cdot 10^{-4}$	0,0735

В результате проведенной калибровки можно сделать вывод, что при расчетах, как единичного, так и множественных определений неопределенности совпадают.

Неопределенность, полученная в процессе проведения калибровки не превышает (0,1), регламентированную для данной методики в паспорте системы ВЭЖХ. Следовательно, данные измерения позволяют убедиться в корректности работы прибора ВЭЖХ.

**Заключение.** В результате исследования была получена методика определения неопределённости при калибровке прибора методом ВЭЖХ на примере стандартного

образца кофеина. Рассчитан бюджет неопределённости, который не превышает неопределённость методики.

### Список литературы

1. Курсаков, С. В., et al. "Разработка и валидация методики определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии." Иммунология 41.1 (2020): 74-82.
2. Сарварова Д. М., Юнусходжаева Н. А., Гулямова Д. Р. Валидации методики контроля качества «цераксидол» раствора для инъекций //Universum: медицина и фармакология. 2022. №. 4 (87). С. 11-15.
3. Аладышева, Ж. И., В. В. Беляев, and В. В. Береговых. "Практические аспекты работ по валидации аналитических методик." Фармация 7 (2008): 9-14.
4. Рябева Е. В. Статистические методы обработки результатов измерений. – 2019.
5. Меркулов, В. А., et al. "Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств. «Химико-фармацевтический журнал» 50.4 (2016): 40-43.
6. Кадис, Р. Л. "Неопределенность измерений и химический анализ." Журнал аналитической химии 63.1 (2008): 104-110.
7. Леонтьев, Д. А., and А. И. Гризодуб. "Метрологический контроль качества результатов измерений." Фармаком 2 (2007): 16-25.
8. Кадис, Р. Л. "Метрологический и статистический смысл понятия "точность" в химическом анализе. ИСО 5725, показатели точности и неопределенность измерений." Заводская лаборатория. Диагностика материалов 12 (2005): 53-59.
9. Р 50.1.062-2007. Статистические методы. Неопределенность при повторных измерениях и иерархических экспериментах, 2008. – URL: <https://files.stroyinf.ru/Data1/54/54171/index.htm> (дата обращения 2024-06-21)
10. Ellison S L R, A Williams A. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. Руководство Еврахим/ Ситак CG 4. Третье издание. – 2012. – URL: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012\\_P1\\_RU.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1_RU.pdf) (дата обращения 2024-06-21).

### References

1. Kursakov, S. V., et al. "Razrabotka i validatsiya metodiki opredeleniya glyukozaminilmuramildipeptida v vodnykh rastvorakh metodom vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii." *Immunologiya* 41.1 (2020): 74-82.
2. Sarvarova D. M., Yunuskhodzhayeva N. A., Gulyamova D. R. Validatsii metodiki kontrolya kachestva «tseraksidol» rastvora dlya in'yektsiy // *Universum: meditsina i farmakologiya*. 2022. №. 4 (87). S. 11-15.
3. Aladysheva, ZH. I., V. V. Belyayev, and V. V. Beregovykh. "Prakticheskiye aspekty rabot po validatsii analiticheskikh metodik." *Farmatsiya* 7 (2008): 9-14.
4. Ryabeva Ye. V. *Statisticheskkiye metody obrabotki rezul'tatov izmereniy*. – 2019.
5. Merkulov, V. A., et al. "Farmakopeynnye standartnyye obraztsy i praktika ikh primeneniya v otechestvennoy sisteme standartizatsii lekarstvennykh sredstv. «Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal» 50.4 (2016): 40-43.
6. Kadis, R. L. "Neopredelennost' izmereniy i khimicheskii analiz." *Zhurnal analiticheskoy khimii* 63.1 (2008): 104-110.
7. Leont'yev, D. A., and A. I. Grizodub. "Metrologicheskii kontrol' kachestva rezul'tatov izmereniy." *Farmakom* 2 (2007): 16-25.
8. Kadis, R. L. "Metrologicheskii i statisticheskii smysl ponyatiya "tochnost'" v khimicheskoy analize. ISO 5725, pokazateli tochnosti i neopredelennost' izmereniy." *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov* 12 (2005): 53-59.
9. R 50.1.062-2007. *Statisticheskkiye metody. Neopredelennost' pri povtornykh izmereniyakh i iyerarkhicheskikh eksperimentakh*, 2008. – URL: <https://files.stroyinf.ru/Data1/54/54171/index.htm> (data obrashcheniya 2024-06-21)
10. Ellison S L R, A Williams A. *Kolichestvennoye opisaniye neopredelennosti v analiticheskikh izmereniyakh. Rukovodstvo Yevrakhim/ Sitak CG 4. Tret'ye izdaniye*. – 2012. – URL: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012\\_P1\\_RU.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1_RU.pdf) (data obrashcheniya 2024-06-21).

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Acknowledgments.** The study did not have sponsorship.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

#### Сведения об авторе

**Мельникова Ольга Александровна** - доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармации, ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», Министерства здравоохранения Российской Федерации, 620028, Россия, г.Екатеринбург, ул.Репина, 3, e-mail: [newfarmacia@mail.ru](mailto:newfarmacia@mail.ru), ORCID 0000-0002-1317-3109, SPIN-код: 1792-5901, Scopus: 57203330590

**Дедюхина Анастасия Владимировна** - магистр направления «Промышленная фармация» ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», Министерства здравоохранения Российской Федерации, 620028, Россия, г.Екатеринбург, ул.Репина, 3, E-mail: [anastasia.suzdalova2016@yandex.ru](mailto:anastasia.suzdalova2016@yandex.ru)

**Мельников Михаил Юрьевич** - доцент кафедры Фармации, ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», Министерства здравоохранения Российской Федерации, 620028, Россия, г.Екатеринбург, ул.Репина, 3, E-mail: [sasha-ber73@mail.ru](mailto:sasha-ber73@mail.ru), ORCID 0000-0002-7415-3689

#### About the author

**Melnikova Olga Alexandrovna** - Professor of the Department of Pharmacy Ural State Medical University, Russia, Ekaterinburg, Repina st., 3, E-mail: [newfarmacia@mail.ru](mailto:newfarmacia@mail.ru), ORCID 0000-0002-1317-3109, SPIN-код: 1792-5901, Scopus: 57203330590.

**Dedyukhina Anastasia Vladimirovna** - Master of Science in Industrial Pharmacy, Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 620028, Russia, Yekaterinburg, Repina St., 3, E-mail: [anastasia.suzdalova2016@yandex.ru](mailto:anastasia.suzdalova2016@yandex.ru)

**Mikhail Yurievich Melnikov** - Associate Professor of the Department of Pharmacy, Ural State Medical University, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ural State Medical University", Ministry of Health of the Russian Federation, 620028, Russia, Yekaterinburg, Repina St., 3, E-mail: [sasha-ber73@mail.ru](mailto:sasha-ber73@mail.ru), ORCID 0000-0002-7415-3689

Статья получена: 15.07.2024 г.

Принята к публикации: 20.12.2024 г.