

Цифровые технологии для определения ЦВЕТНОСТИ и БЕЛИЗНЫ лекарственных средств



■ Л.В. Рудакова



■ А.П. Васильева



■ Г.И. Шведов



■ Е.В. Поплавская

Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко

Проблема качества лекарственных средств – одна из «вечных» проблем в фармации и медицине. В силу целого ряда различных причин субъективного и объективного характера, она особенно остро встала в последнее время и заставляет акцентировать внимание на методах оценки соответствия препаратов требованиям и нормам, принципах их стандартизации. В настоящее время в обиход фармацевтического анализа вошли многие современные методы, обеспечивающие получение уникальной информации и позволяющие реализовать современные требования к качеству, глубине и диапазону анализа лекарственных веществ и препаратов. Однако современное аналитическое оборудование имеет достаточно высокую стоимость, требует дорогого сервисного обслуживания, высокой специальной квалификации операторов. Поэтому для контроля качества сырья, промежуточной и готовой фармацевтической продукции на региональном уровне актуальными остаются экспрессные, требующие минимальной пробоподготовки и сравнительно недорогого оборудования, тест-методы анализа.

На рубеже XX–XXI веков – начале этого века как новый оптический метод анализа, альтернативный спектрофотометрии, выделилась **цифровая цветометрия (Digital Color Analysis (DCA) – «цифровой анализ цвета»)** [1-3]. Цифровым анализатором цвета может являться любое устройство, позволяющее регистрировать изображение и сохранять его в **цифровом формате**, будь то **цифровой фотоаппарат, сканер, видео- или веб-камера**. Полученную цифровую информацию о цвете можно рассматривать как аналитическую, причем оперировать ею с помощью компьютера (обрабатывать, интерпретировать, сохранять и передавать данные) можно в том же полученном формате, что выгодно отличает метод от классической **спектрофотометрии**, делает его более информативным, доступным, документальным и зачастую более экспрессным. В отличие от колориметрического анализа, который применяется, прежде всего для полуколичественных определений, цифровой анализ цвета может обеспечивать получение **точных количественных результатов**.

Теоретическое обоснование и методология применения цифровых технологий в цветиметрических измерениях описаны достаточно полно в доступных научных публикациях [1-8]. Существует множество цветовых моделей, разработанных для представления и описания цвета на компьютере [9]. Наиболее часто в цифровых технологиях используются цветовые модели **RGB, CMYK, XYZ, HSB и CIELAB** [10]. Из различных способов представления цвета для последующей компьютерной обработки чаще всего в цветиметрии применяют трехкомпонентную цветовую схему **RGB**. Система **RGB** является аддитивной, т.е. цвета представляются сложением основных цветов с чёрным цветом (0,0,0). **Базисный белый цвет** оценивается как $FW=(255,255,255)$, **моделный красный цвет** – $FR=(255,0,0)$, **зелёный** – $FG=(0,255,0)$, **синий** – $FB=(0,0,255)$, **жёлтый** – $FY=(255,255,0)$ и т.д. К ее преимуществам можно отнести то, что разделение светового излучения на 3 составля-

ющие удобно для соотнесения с человеческим зрением (из-за наличия в сетчатке глаза соответствующих волокон). Система **XYZ** получена расчетным путем из системы **RGB**. Основные цвета в системе **XYZ** представляют собой сумму основных цветов **RGB**, взятых с определенными коэффициентами. В свою очередь координаты цвета в **системе Lab** являются производными от координат системы **XYZ**. В основе **цветовых систем CMYK и HSB** лежит та же система **RGB**.

Для компьютерной обработки изображений используют профессиональные **графические редакторы (Adobe Photoshop, Photo-paint и др.)**; а также компьютерные денситометры (входят в состав программного обеспечения специализированных приборов), **«колорпикеры» (средства определения цветовых параметров пикселя)** и **универсальные математические пакеты с возможностью работы с цифровым изображением на уровне пикселей (MatLab, MathCAD)**.

В фармацевтической промышленности и биотехнологии цвет традиционно служил одним из критериев соответствия продукции требуемым нормам. Интенсивность окраски при этом определялась чаще всего визуально-экспертным путем. В лучшем случае цвет анализируемого образца сопоставляется с цветом стандартного образца, или цветом стандартного набора, или шкалы.

Определение наличия или отсутствия цветового или сероватого оттенка является обязательным требованием при определении степени белизны порошкообразных лекарственных средств.

Государственная Фармакопея в случае твердых субстанций предлагает оценивать степень белизны (оттенка), исходя из спектральной характеристики света, отраженного от образца. Степень приближенности отражательной способности поверхности образца к идеальной белой поверхности с идеальным рассеиванием в технике называется белизной. Ее определение является необходимым

параметром при оценке соответствия фармацевтического продукта государственному стандарту.

Белизна в значительной степени является величиной субъективной. Для ее количественного определения применяются специализированные приборы, по принципу действия аналогичные лабораторным фотоэлектроколориметрам и выражающим значения в условных единицах. **Государственная Фармакопея СССР XI издания** предлагает использовать **лейкометры или спектральные фотометры**, а для уточненной оценки белизны лекарственных веществ рекомендует **спектрофотометры отражения**, снабженные интегрирующей сферой. В линейке современных приборов этих устройств уже нет. Им на смену пришли такие аналоги, как **Спектрофотометр CARY 100**, предназначенный для решения целого ряда задач: **определения белизны порошков, определения цветности порошков и инъекционных растворов, определения цветности дистиллированной воды, определения суммарной флуоресценции**. Стоимость приборов такого класса соответствует уровню его возможностей.

Нами разработан и опробован [11] **альтернативный метод** определения степени белизны порошкообразных и таблетированных лекарственных средств путем анализа графических изображений объектов анализа, получаемых при сканировании образцов с помощью обычного планшетного сканера (ПС). При сканировании использовали специально сконструированную цилиндрическую металлическую ячейку (Ø15 мм, h=15 мм) с прозрачным дном из оптического стекла. Верхняя крышка ячейки при закручивании давила на пуансон, что позволяло спрессовывать порошки до состояния удаления воздуха между частицами. Таким образом, устройство служило и ячейкой для сканирования, и мини-прессом для минимизации насыпной плотности порошков (рис. 1). Исключали паразитные засветки детектора сканера. Для этого стеклянный стол закрывали накладкой из белого пластика с отверстием, равным диаметру ячейки для сканирования.

Ячейку помещали прозрачным дном на стеклянный стол планшетного сканера, управляемого персональным компьютером, и сканировали, соблюдая следующие условия: **цветовой режим True Color (16,5 млн. цветовых оттенков), оптическое разрешение – 300 dpi, режим сканирования плоских оригиналов, формат сохранения файлов – jpg**. Количественную оценку белизны осуществляли в рамках цветовой модели **RGB**, где яркость измеряется от 0 (min) до 255 (max) условных единиц, а цвет определяется смешиванием каналов **R, G, B**. Белому цвету соответствует триплет значений **R,G,B (255; 255; 255)**. Проведенные тест-испытания показали, что не менее успешно использовать и другие цветовые пространства.

Для анализа и обработки изображений (рис. 2) использовали программное обеспечение в среде пакета **MathCad**, позволяющее, по выделяемой мышью области, получать усредненные значения цветовых параметров модели (яркостей красного **R**, зелёного **G** и синего **B** каналов). Данные



Рис. 2. Цифровые изображения отсканированных образцов

по цветности образцов можно анализировать внутри программы или сохранять в формате табличного процессора **Excel**.

Для количественного выражения белизны, т.е. степени приближения к идеально белому цвету, использовали значение относительной белизны $W_{отн}$, которое определяется как отношение суммы параметров яркости по каналам **R, G и B** для образца и абсолютно белого вещества:

$$W_{отн} = \frac{R + G + B}{R_0 + G_0 + B_0} \cdot 100\%$$

где **R, G, B** – яркость соответствующего канала модели **RGB**; $R_0 = G_0 = B_0 = 255$ – яркость соответствующих каналов абсолютно белого вещества.

Показано, что препараты, оцениваемые человеческим глазом как белые, аппаратно регистрируются как объекты, обладающие разной степенью белизны (рис. 3).

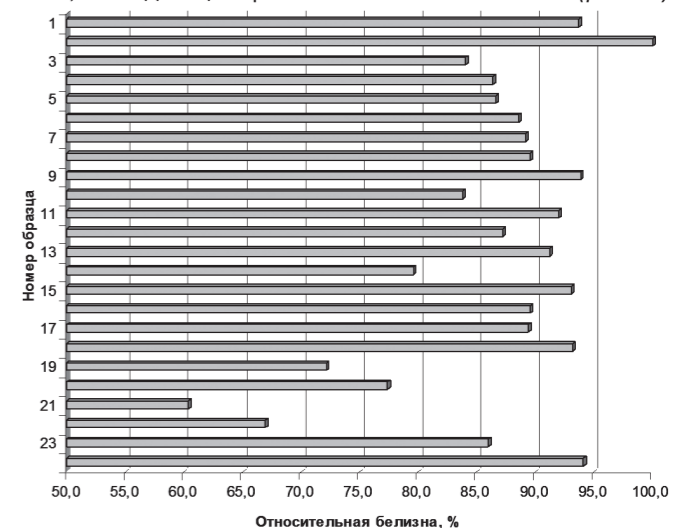


Рис. 3. Относительная белизна образцов лекарственных препаратов

Таким образом, появляется возможность перейти от субъективной визуальной характеристики лекарственных препаратов к объективной количественной оценке степени их белизны и соответствию критериям качества.

Для определения диапазона значений $W_{отн}$, в котором можно говорить об этом соответствии, была выполнена статистическая обработка данных ряда серий проведенных измерений. Для серии бумажных эталонов основных и дополнительных цветов (в соответствии с моделью **RGB**) были проведены сравнительные измерения на сканерах различных фирм и различных конфигураций. Показано, что межлабораторная погрешность измерений соответствует средней ошибке инструментальных методов анализа, причем, чем ближе белизна анализируемого объекта к абсолютному значению, тем меньше погрешность определения.

Использование нормированных диапазонов возможных значений параметра относительной белизны может быть использовано для экспресс-анализа в процессе производства, в контроле качества готовой продукции, для изучения динамики старения продукции. При хорошей воспроизводимости сканерметрическая методика отличается несколько большей погрешностью измерений, чем оптиче-



Рис. 1. Цилиндрическая металлическая ячейка Ø 15 мм, h=15 мм с прозрачным дном из оптического стекла. Крышка ячейки и пуансон является мини-прессом

ский прибор (например, белизнамер), но вполне подходит для экспресс-тестов. Бытовые сканеры, по всей видимости, являются менее чувствительными, чем профессиональные белизнамеры, принцип действия которых основан на измерении коэффициента отражения видимого спектра лучей в заданном интервале длин волн от уплотненно-сглаженной поверхности пробы и определения показателя белизны. Вместе с тем, они позволяют стандартизировать условия регистрации белизны. Важным достоинством сканера является наличие встроенной системы освещения с автоматической калибровкой баланса белого цвета и чувствительности в каждом цикле сканирования. Инструментальный цифровой метод устраняет субъективность, характерную для визуальных определений, позволяет документировать результаты измерений и хранить их в виде электронных файлов. Одновременно он отличается низкой себестоимостью единичного измерения и экспрессностью регистрации сигнала.

Аналогичный подход возможен и для оценки цветности жидких лекарственных препаратов. **Государственная Фармакопея РФ** в общей статье рекомендует для оценки окраски жидкостей колориметрическую методику. Традиционно окраску жидкостей определяют визуально путем сравнения с соответствующими эталонами. Приготовление эталонов – процесс достаточно трудоемкий и продолжительный, срок годности же основных растворов – 1 год, а эталонных – всего несколько дней или несколько часов. Использование цифровой цветиметрической методики (ЦЦМ) снимает проблемы пробоподготовки и субъективности визуальной оценки. В работах [12-13] анализируемые жидкие системы помещали в оптическую кювету и проводили регистрацию изображений с помощью цифрового фотоаппарата в специальном боксе, обеспечивающем постоянные условия освещения, или использовали планшетный сканер. Для цифровой фоторегистрации использовали специальный бокс, позволяющий стандартизировать условия освещения (рис. 4). Кювету, заполненную исследуемым раствором, устанавливали в бокс и регистрировали изображение. Для уменьшения нежелательных засветок внутренняя поверхность бокса была покрыта черной краской. Для освещения бокса использовали 2 галогеновые лампы общей мощностью 80 Вт. **Условия съемки: формат сохранения графической информации – JPEG, размер изображения – 1 мегапиксель, вспышка – отключена, светочувствительность – 100 ISO или «Авто», параметры баланса белого – «Лампа накаливания».**

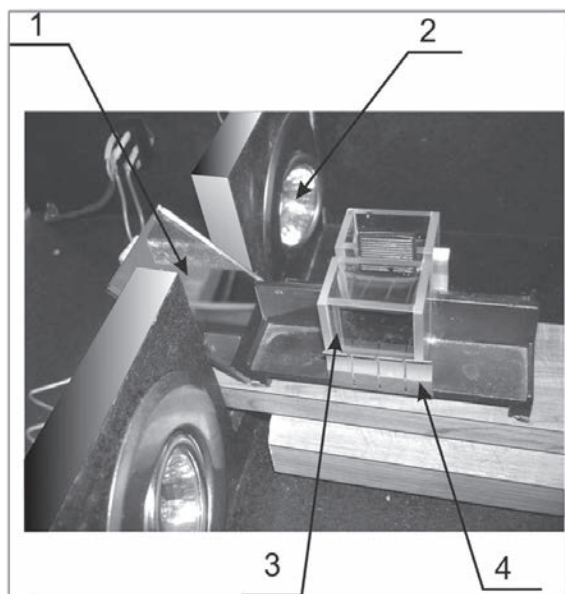


Рис. 4. Фотографический бокс: 1 – оборачивающее зеркало; 2 – лампы подсветки; 3 – стеклянная кювета; 4 – кюветодержатель

В рамках разработанной сканерметрической методики регистрацию цифровых изображений анализируемых образцов осуществляли с помощью ПС со слайд-адаптером, оснащенного специально сконструированным кюветодержателем, который состоит из светонепроницаемого корпуса и системы зеркал, что позволяет изменять направление освещения от слайд-адаптера через кювету с образцом к оптическому сенсору сканера. Количественное определение цветности проводили в рамках программы MathCAD или Adobe Photoshop.

С помощью данной методики количественно охарактеризована таблица фармакопейных эталонов для определения окраски жидкостей в координатах цветовой модели RGB. Показана возможность применения цифровых технологий не только для качественных, но и количественных определений биологически активных веществ и лекарственных средств, имеющих собственную окраску, и по продуктам цветных реакций, используемых в фармакопейных тестах. Например, для водных растворов аминокислот, ряда лекарственных препаратов (салициловая кислота, аналгин, доксициклин, ампициллин, бензилпенициллина натриевая соль, эуфиллин) были проведены соответствующие цветные тесты и фармакопейные реакции. Полученные окрашенные растворы характеризуются устойчивой во времени цветностью и высокой степенью прозрачности. Результаты проведенного ЦМ анализа с применением ПС, показали закономерное изменение RGB-параметров в зависимости от концентрации растворов. Наиболее выражена эта зависимость оказалась для той цветовой компоненты, которая в каждом случае является дополняющим цветом по отношению к цвету окрашенного раствора. Зависимости, по выбранным компонентам линеаризуются, с высокой степенью корреляции ($R^2 \geq 0,99$). Также показано, что цифровая цветиметрия может быть использована при изучении динамики старения лекарственных препаратов для определения их подлинности и качества.

ЛИТЕРАТУРА

- Hirayama E., Sugiyama T., Hisamoto H., Suzuki K. // *Anal. Chem.* 2000. Vol. 72. N 3. P. 465–474.
- Иванов В.М. Химическая цветиметрия: возможности метода, области применения и перспективы / В.М.Иванов, О.В.Кузнецова // *Успехи химии.* – Т.70. – 2001, №5. – С. 411 – 428.
- Кривошеев М.И. Цветовые измерения / М.И. Кривошеев, А.К. Кустарев. – М.: Энергоатомиздат, 1989. – 241 с.
- Soldat D.J., Barak Ph., Lepore B.J. Microscale Colorimetric Analysis Using a Desktop Scanner and Automated Digital Image Analysis // *J. Chem. Educ.* 2009. 86 (5). P. 617.
- Шишкин Ю.Л., Дмитриенко С.Г., Медведева О.М., Бадакова С.А., Пяткова Л.Н. Применение сканера и компьютерных программ цифровой обработки изображений для количественного определения сорбированных веществ // *Журн. аналит. химии.* 2004.Т. 59. №2.
- Зяблов А.Н. Цифровая обработка изображений. Достоинства и недостатки / А.Н. Зяблов, Ю.А. Жиброва, В.Ф. Селеменев // *Сорбционные и хроматографические процессы.* – 2006. – Т. 6, Вып. 6. – С. 1424 – 1429.
- Байдичева О.В., Хрипушин В.В., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б. Цветиметрия – новый метод контроля качества пищевой продукции // *Пищевая промышленность.* 2008. № 5. С. 20–22.
- Рудаков О.Б., Королькова Н.В., Полянский К.К., Котик О.В., Рудакова Л.В. Технохимический контроль жиров и жирозаменителей. С.–П.: Лань, 2011. 576 с.
- Компьютерное зрение / Л. Шапиро, Дж. Стокман; Пер.с англ. – М. БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. –752 с.
- Пантелеев В.Г. Компьютерная микроскопия / В.Г. Пантелеев [и др.]. – М.: Техносфера, 2005. – 304 с.
- Рудакова Л.В., Дурицын Е.П., Смородникова О.А., Байдичева О.В. // мат. I Всерос. Конф. «Современные методы химико-аналитического контроля фармацевтической продукции». Москва: Из-во МИСиС, 2009. С. 118–119.
- Рудакова Л.В., Шведов Г.И., Илюшина Т.Н., Фисунова М.К., Тихонова О.С. // I Всерос. конф. «Современные методы химико-аналитического-го контроля фармацевтической продукции». Москва: Из-во МИСиС, 2009. С. 116–117.
- Рудакова Л.В., Байдичева О.В., Дурицын Е.П., Ветрова Е.Н. // *Материалы III Всерос. конф. с международным участием «Аналитика России».* Краснодар, 2009. С. 418