

Приклад 1

Валідація методики кількісного визначення таблеток амброксолу методом спектрофотометрії

Об'єкт дослідження

Таблетки амброксолу гідрохлориду (АГХ) 0.030 г масою 0.100 г, які містять крохмаль бульбовий, цукор молочний і кальцію стеарат як допоміжні речовини.

Допуски вмісту АГХ: 92.7–107.3 % від номінальної кількості вмісту АГХ в препараті, що відповідає $B = 7.3$ %.

Завдання

Валідувати методику, яка була б придатною одночасно для кількісного визначення, випробувань «Однорідність вмісту» і «Розчинення».

Усі три методики кількісного аналізу виконуються за допомогою прямої спектрофотометрії за власним поглинанням амброксолу в 0.01 М кислоті хлористоводневій за 244 нм, що дозволяє провести для них одночасну валідацію.

Матеріали і реактиви

Під час проведення досліджень використовували субстанцію АГХ, крохмаль, лактозу і кальцію стеарат, які відповідали вимогам Фармакопеї. Як стандартний зразок використовували фармакопейний стандартний зразок (ФСЗ) АГХ серії 120104. Використовувані реактиви і титровані розчини відповідали вимогам Фармакопеї.

Аналітичне обладнання

Спектрофотометр Specord 200, який відповідав вимогам загальної статті «Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях» (2.2.25); ваги Sartorius MC 210S. Мірний посуд класу А (першого класу), який відповідав вимогам Фармакопеї.

Валідаційні критерії (у нормалізованих координатах)

Використаємо вимоги Табл. 4.1 розділу 4.

Нормалізовані координати: див. співвідношення (4.1).

Методика валідується для кількісного визначення (КВ), випробувань на однорідність вмісту (ОВ) і розчинення (Р), тому, відповідно до підходу розділу 4.4.3.2, беремо вимоги до КВ і діапазон для Р.

Допуски вмісту: 92.7–107.3 % від номінального вмісту. $B = 7.3$ %.

Діапазон: 60–135 % від номінальної концентрації, 9 точок, шаг 9.375 %, $SD_{range} = 25.67\%$.

Прийнятність повної відносної невизначеності (Δ_{As}) і систематичної похибки (δ) методики для $B = 7.3\%$:

- $\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 2.34\%$;
- $\delta \leq \max \delta = 0.75\%$.

Характеристики лінійності:

- залишкове стандартне відхилення $SD_o \leq \max SD_o = 1.23\%$;
- коефіцієнт кореляції $R_c \geq \min R_c = 0.99885$;
- відрізок, що відтинається на осі ординат:
 - статистична незначущість: $a \leq \max a = 1.89 \times s_a$;
 - практична незначущість: $a \leq \max a = 2.4\%$.

Межа виявлення: $ПО \leq 32\%$.

Межа кількісного визначення: $ПКО \leq 32\%$.

П.1.1. Методики аналізу, що валідуються

Кількісне визначення

Близько 0.10 г (точна наважка) порошку розтертих таблеток препарату поміщають у мірну колбу місткістю 100.0 мл, додають 50 мл 0.01 М розчину кислоти хлористоводневої, перемішують 10 хв, доводять тією самою кислотою до мітки, фільтрують через фільтр «Міліпор» із діаметром пор не більше 0.5 мкм. 10.0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100.0 мл і доводять до мітки 0.01 М розчином кислоти хлористоводневої. Вимірюють оптичну густину отриманого розчину за довжини хвилі 244 нм, використовуючи як компенсаційний розчин 0.01 М розчин кислоти хлористоводневої.

Випробовуваний розчин. Розчин препарату, приготований за методикою.

Розчин порівняння. 0.030 г (точна наважка) ФСЗ АГХ поміщають у мірну колбу місткістю 100.0 мл, розчиняють у 50 мл 0.01 М розчину кислоти хлористоводневої і далі чинять, як описано вище для препарату.

Однорідність дозування

Одну таблетку поміщають у мірну колбу місткістю 100.0 мл і далі чинять, як описано вище для кількісного визначення.

Вимоги: відповідність вимогам загальної статті Фармакопеї «Однорідність дозованих одиниць» (2.9.40).

Розчинення. Середовище розчинення — 0.01 М розчин кислоти хлористоводневої, об'єм середовища — 1000 мл. Прилад із кошиком (загальна

стаття «Тест “Розчинення” для твердих дозованих форм» (2.9.3)), швидкість обертання — 100 об/хв, час розчинення — 30 хв. У кошик поміщають одну таблетку.

Через 30 хв відбирають 25 мл рідини і фільтрують через фільтр «Міліпор» із діаметром пор не більше 0.5 мкм, відкидаючи перші 5 мл розчину. Вимірюють оптичну густину отриманого розчину за довжини хвилі 244 нм, використовуючи 0.01 М розчин кислоти хлористоводневої як компенсаційний розчин.

Вимоги: $\geq 80\%$ від номінального вмісту АГХ в препараті.

П.1.2. Специфічність

У разі неспецифічних методик аналізу (наприклад, спектрофотометрія) підтвердження специфічності для виконання поставленого завдання полягає в доведенні того, що відносна систематична похибка (δ_{noise} , %), спричинена допоміжними речовинами і продуктами деградації у визначенні аналізованої речовини, є незначущою порівнюючи з максимально допустимою невизначеністю методики аналізу (Δ_{As} , %).

Для перевірки специфічності доцільно застосувати підхід, описаний у п. 4.4.6.2.2 розділу 4. Частка (у % щодо аналізованої речовини) суми домішок, яка знайдена у випробовуваному розчині внутрішньою нормалізацією методом ВЕРХ із спектрофотометричним детектором за аналітичної довжини хвилі спектрофотометричного аналізу (у нашому випадку 244 нм), не має перевищувати максимально допустимої систематичної похибки $\max \delta = 0.73\%$ (див. Табл. 4.1), тобто потрібно дотримуватися співвідношення (4.23).

Під час дослідження таблеток, термін зберігання яких збіг, було знайдено $\delta_{imp} = 0.50\% < \max \delta = 0.73\%$, тобто специфічність виконується.

П.1.3. Модельні розчини, виконання вимірювань і розрахунки

Оскільки розчин порівняння і модельні розчини готувалися за тією самою схемою, то фактичні величини X_i зі співвідношення (4.1) дорівнюють просто відношенню фактичних наважок субстанції АГХ, які були взяті для приготування цього модельного розчину і розчину порівняння. У Табл. П.1.2 наведені фактичні величини $X_{i \text{ факт.}}$.

Проводять вимірювання оптичної густини кожного розчину з вийманням кювети. Вимірювання проводять за такою схемою: розчин порівняння (3 тричі), модельні розчини 1-3 (3 тричі), розчин порівняння (тричі), модельні розчини 4-6 (тричі), розчин порівняння (тричі), модельні розчини 7-9 (тричі), розчин порівняння (тричі). У підсумку одержують 12 значень оптичних густин для розчину порівняння і по 3 значення оптичної густини для кожного з 9 модельних розчинів. Розраховують відношення середніх значень оптичних густин для кожного з 9 розчинів до середнього значення оптичної густини для

розчину порівняння, отримуючи величини $Y_i = (A_i / A_{st}) \times 100$. Знаходять також величину $Z_i = 100 \times (Y_i / X_i)$, яка являє собою знайдену концентрацію у відсотках до введеної. Результати розрахунків наведені в Табл. П.1.2. Критерії узяті з Табл. 4.1.

Розрахунки параметрів лінійної залежності $Y = b \times X + a$ проводять методом найменших квадратів. Результати розрахунків — величини b , s_b , a , s_a , s_r (залишкове стандартне відхилення) і R_c (коефіцієнт кореляції) — наведені в Табл. П.1.1, а одержана в нормалізованих координатах пряма — на Рис. П.1.1. Вона достатньо типова для всіх випадків застосування методу стандарту, незалежно від специфіки методики (спектрофотометрія, рідинна або газова хроматографія).

П.1.4. Внутрішньолабораторна прецизійність

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводять на 5 зразках однієї серії препарату. Проводять аналіз для кожного зразка (i) за методикою, виконуючи по 3 паралельних вимірювання для кожного з розчинів. Розраховують величини Z_i за співвідношенням (4.1) (зразок 1).

Проводять такий самий аналіз цієї самої серії із тим самим числом паралельних зразків (5) з іншим аналітиком в інші дні і з використанням іншого мірного посуду (зразки 2 і 3). Об'єднують знайдені величини Z_i , %, розраховують середнє значення \bar{Z} і стандартне відхилення SD_{intra} і перевіряють виконання співвідношення (4.21). Отримані дані представлені в Табл. П.1.3.

П.1.5. Дослідження стабільності

У методиці не регламентують час, через який проводиться вимірювання оптичної густини, тому перевіряють її стабільність протягом 1 год. Для цього вимірюють по тричі з вийманням кювети оптичну густину випробовуваного розчину (A) і розчину порівняння (A_o) відразу після приготування розчинів, через 15 хв, через 30 хв, через 45 хв і 60 хв. Результати представлені в Табл. 2.5. Розраховують довірчий інтервал і перевіряють виконання співвідношення (4.22). У нашому випадку (див. Табл. 4.1) $max \delta = 0.75 \%$.

П.1.6. Результати і їх обговорення

П.1.6.1. Специфічність

За даними П.1.2 оцінюють специфічність. Було знайдено $\delta_{imp} = 0.50 \%$. З п. «Валідаційні критерії» (див. вище) $max \delta = 0.73 \%$. Як видно, $0.50 \% < 0.73 \%$, тобто співвідношення (4.23) зберігається, фонове поглинання є незначущим і методика характеризується достатньою специфічністю.

П.1.6.2. Лінійність

Як видно з Табл. П.1.1, у нашому випадку виконуються вимоги Табл. 4.1 до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується в усьому діапазоні концентрацій 60-135 %.

Таблиця П.1.1

Метрологічні характеристики лінійної залежності $Y = b \times X + a$

Назва величини	Значення	Критерії Табл. 4.1 (для допусків 92.7-107.3 %, число точок 9)	Висновок (відповідає чи ні)
b	0.9937	—	—
s_b	0.0087	—	—
a	0.775	(1) $\leq 1.89 \times s_a = 1.63$; (2) якщо не виконується (1), то ≤ 2.4 ;	відповідає
s_a	0.861	—	—
s_r	0.584	≤ 1.24	—
R_c	0.99973	≥ 0.99885	відповідає

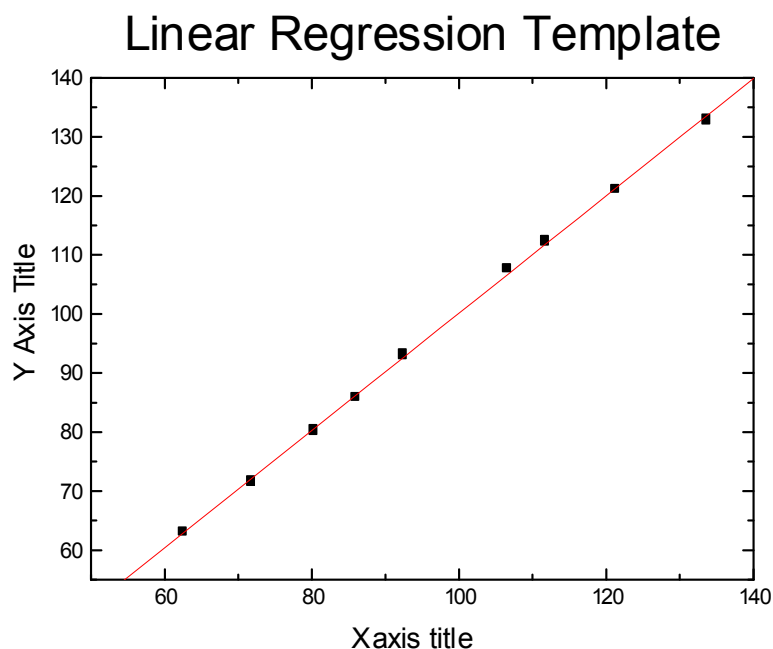


Рисунок П.1.1. Лінійна залежність оптичної густини від концентрації амброксолу гідрохлориду в нормалізованих координатах

П.1.6.3. Межа виявлення і межа кількісного визначення

Розрахунки межі виявлення (DL) і межі кількісного визначення (QL) АГХ проводять факультативно (оскільки вони не є обов'язковими у випадку

кількісного визначення) за співвідношеннями (4.19-4.20) за даними Табл. П.1.1 на основі величин s_a і b :

$$DL = 3.3 \times 0.861 = 2.84 \% < 32 \% \text{ від номінальної концентрації АГХ;}$$

$$QL = 10 \times 0.861 = 8.61 \% < 32 \% \text{ від номінальної концентрації АГХ (0.03 мг/мл — за методикою).}$$

Як видно, ці величини значно менше нижньої межі діапазону концентрацій (60 %) і тому не можуть впливати на точність аналізу.

П.1.6.4. Прецизійність і правильність

П.1.6.4.1. Збіжність і правильність

Із Табл. П.1.2 видно, що методика аналізу характеризується достатньою збіжністю і правильністю в усьому діапазоні концентрацій 60-135 %.

Таблиця П.1.2

Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка (використані критерії Табл. 4.1)

№ модел ьного розчи ну	Наважки АГХ, г ($m_{st} =$ 0.02974)	Введено у % до концентрації розчину порівняння, $X_{i \text{ факт.}}, \%$	Середні оптичні густини ($A_i^{st} =$ 0.7322)	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння, $Y_i, \%$	Знайдено у % до введеного $Z_i =$ $100 \times (Y_i / X_i),$ %
1.	0.01859	62.51	0.4619	63.07	100.9
2.	0.02134	71.77	0.5240	71.56	99.71
3.	0.02387	80.29	0.5871	80.18	99.86
4.	0.02555	85.92	0.6290	85.92	99.99
5.	0.02748	92.41	0.6812	93.03	100.68
6.	0.03170	106.62	0.7879	107.6	100.91
7.	0.03321	111.68	0.8224	112.31	100.56
8.	0.03607	121.29	0.8948	121.2	100.75
9.	0.03975	133.66	0.9725	132.82	99.37
Середнє, $\bar{z}, \%$					100.30
Відносне стандартне відхилення, $s_z, \%$					0.58
Відносний довірчий інтервал $\Delta \% = t(95 \%, 8) \times s_z = 1.860 \times s_z =$					1.07
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta \% \leq$					2.34
Систематична похибка $\delta = \bar{z} - 100 $					0.30

Критерій незначущості систематичної похибки (1) $\delta \leq \Delta / 3 = 1.07 / 3 = 0.36$; (2) якщо не виконується (1), то $\delta \leq 0.75$	виконується виконується
Загальний висновок про методуку	коректна

П.1.6.4.2. Внутрішньолабораторна прецизійність

Таблиця П.1.3

Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величини Z_i		
	1-й дослід	2-й дослід	3-й дослід
1	99.42	99.66	99.96
2	99.57	99.76	98.87
3	97.23	96.99	99.09
4	97.53	97.63	98.61
5	99.53	99.12	98.53
Середнє	98.65	98.63	99.01
Об'єднане середнє, $\overline{z_{intra}}$, %	98.77		
S_z , %	1.17	1.25	0.57
SD_z , %	1.04		
Δ_{intra} , % ($k = 5$)	$= 0.79 \times 1.04 = \mathbf{0.82} < 2.34$ %		

Як видно, співвідношення (4.21) виконується, тобто внутрішньолабораторна прецизійність підтверджується.

П.1.6.5. Стабільність розчинів у часі

Таблиця П.1.4

Стабільність розчинів у часі

t , хв	0	15	30	45	60	Середнє	RSD_t , %	Δ_t , %	$\max \delta$, %
A_o	0.7560	0.7567	0.7595	0.7592	0.7618	0.7586	0.307	0.65	0.75
A	0.7522	0.7527	0.7539	0.7549	0.7567	0.7541	0.238	0.51	

Як видно, $\Delta_t \leq \max \delta = 0.75 \%$, тобто випробовуваний розчин і розчин порівняння стабільні протягом не менше 1 год.

П.1.6.6. Прогноз повної невизначеності методики аналізу

Для підтвердження коректності методики під час відтворення в іншій лабораторії необхідно провести прогноз повної невизначеності методики.

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально допустиму невизначеність результатів аналізу із Табл. 4.1 для допусків вмісту $B = 7.3 \%$ ($\max \Delta_{As} \leq 2.34 \%$). Повну прогнозовану невизначеність розраховують за формулою (4.25). У нашому випадку невизначеність кінцевої аналітичної операції (спектрофотометрія) відома: відповідно до співвідношення (4.27) вона дорівнює 0.70 %. Тому розраховують невизначеність пробопідготовки, яка відрізняється для різних кількісних методик.

П.1.6.6.1. Прогноз невизначеності пробопідготовки

Розрахунки проводять за співвідношенням (4.26) на підставі розрахункової формули методики і використовуючи підхід і граничні невизначеності мірного посуду, які описані в Табл. 4.2.

Кількісне визначення

$$\text{Розрахункова формула: } X = \frac{D_1 \times m_0 \cdot 10 \times 100 \times 100 \times b}{D_0 \times m_1 \times 100 \times 100 \times 10} \cdot \frac{P}{100}.$$

Таблиця П.1.5

Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
<i>Розчин порівняння</i>		
1. Взяття наважки СЗ амброксолу гідрохлориду	m_0	$0.2 \text{ мг} / 30 \text{ мг} \times 100 = 0.67$
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл	100	0.12
3. Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	10	0.25
4. Доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл	100	0.12

<i>Випробовуваний розчин</i>		
5. Взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг} / 100 \text{ мг} \times 100 = 0.20$
6. Доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл	100	0.12
7. Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	10	0.25
8. Доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл	100	0.12

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0.67^2 + 0.12^2 + 0.25^2 + 0.12^2 + 0.2^2 + 0.12^2 + 0.25^2 + 0.12^2} = 0.82\%$$

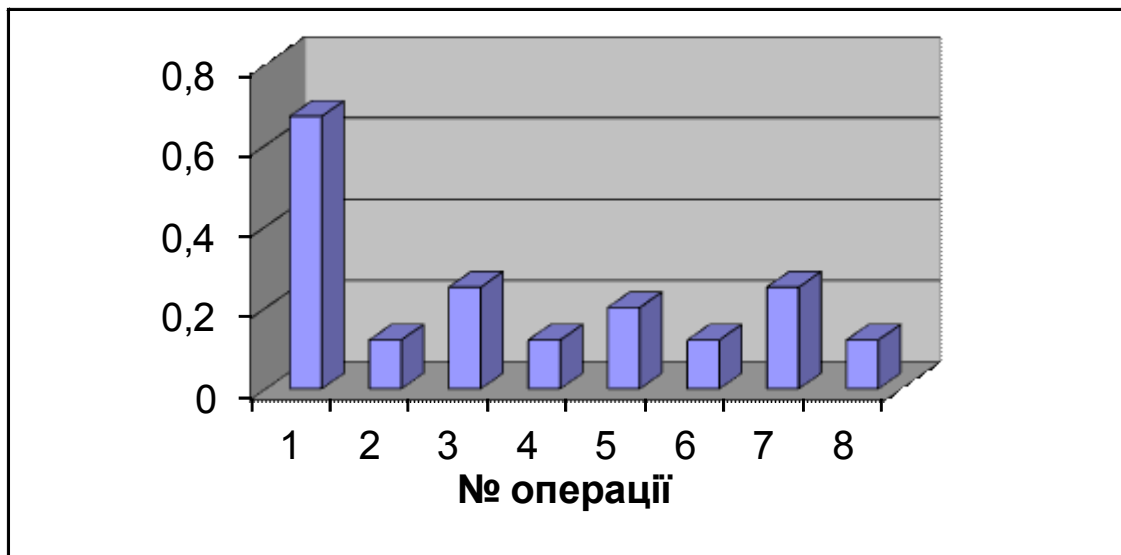


Рисунок П.1.2. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток амброксолу

З Рис. П.1.2 видно, що найбільшу невизначеність у пробопідготовку вносить операція 1 — взяття наважки ФСЗ амброксолу 30 мг, а також операції 3 і 7 — взяття аліквоти 10 мл. Такий розподіл складових невизначеності пробопідготовки є достатньо характерним під час контролю якості лікарських засобів.

Однорідність вмісту

Таблиця П.1.6

Розрахунок невизначеності пробопідготовки для однорідності вмісту

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової	Невизначеність, %
--------------------------	------------------------	-------------------

	формули	
<i>Розчин порівняння</i>		
1. Взяття наважки СЗ амброксолу гідрохлориду	m_0	$0.2 \text{ мг} / 30 \text{ мг} \times 100 = 0.67$
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл	100	0.12
3. Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	10	0.25
4. Доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл	100	0.12
<i>Випробовуваний розчин</i>		
5. Доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл	100	0.12
6. Взяття аліквоти піпеткою 5 мл	5	0.37
7. Доведення до об'єму в мірній колбі 50 мл	50	0.17

$$\Delta_{sp} = \sqrt{0.67^2 + 0.25^2 + 0.12^2 + 0.12^2 + 0.12^2 + 0.37^2 + 0.17^2} = 0.85\%$$

Розчинення

Таблиця П.1.7

Розрахунок невизначеності пробопідготовки для тесту «Розчинення»

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
<i>Розчин порівняння</i>		
1. Взяття наважки СЗ амброксолу гідрохлориду	m_0	$0.2 \text{ мг} / 30 \text{ мг} \times 100 = 0.67$
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл	100	0.12
3. Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	10	0.25
4. Доведення до об'єму в мірній колбі	100	0.12

100 мл		
<i>Випробовуваний розчин</i>		
5. Доведення до об'єму циліндром 1000 мл	1000	1.0

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0.67^2 + 0.25^2 + 0.12^2 + 0.12^2 + 1.0^2} = 1.24\%$$

П.1.6.6.2. Повна невизначеність аналітичної методики

Кількісне визначення:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{0.82^2 + 0.70^2} = 1.08\% \leq \max \Delta_{As} = 2.34\% .$$

Однорідність вмісту:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{0.85^2 + 0.70^2} = 1.10\% \leq \max \Delta_{As} = 2.34\% .$$

Розчинення:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{1.24^2 + 0.70^2} = 1.42\% \leq \max \Delta_{As} = 2.34\% .$$

Як видно, прогнозована повна невизначеність результатів для всіх трьох методик аналізу не перевищує критичного значення (2.34 %), тобто методики будуть давати коректні результати і в інших лабораторіях.

П.1.6.7. Робасність

Під час перевірки робасності у випадку спектрофотометрії необхідно вивчити: стабільність розчинів у часі, вплив рН, різних реактивів, аналітиків (суб'єктивний фактор). У нашому випадку оптична густина в межах $\pm 10\%$ не залежала від кислотності розчину. Стабільність розчинів підтверджує П.1.6.5. Незначущість впливу реактивів, обладнання і суб'єктивного фактора була підтверджена під час передачі методики.

Отже, валідація підтверджує коректність методик кількісного визначення, однорідності вмісту і розчинення таблеток амброксолу 0.030 г.

Розглянута схема валідації може бути без якихось суттєвих змін застосована і до хроматографічних методик кількісного визначення у варіанті методу стандарту.

Для реалізації запропонованих підходів доцільно використовувати програмне забезпечення.