

Приклад 6

Валідація методики кількісного визначення субстанції таурину методом індикаторного кислотного-основного титрування

П.6.1. Методика

Близько $m_T = 250$ мг (точна наважка) субстанції розчиняють у 30 мл води P , додають 5.0 мл розчину формальдегіду P і титрують 0.1 М розчином натрію гідроксиду до появи слабо-рожевого забарвлення (індикатор — 0.1 мл розчину фенолфталеїну $P1$).

Паралельно проводять контрольний дослід.

1 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 12.52 мг $C_2H_7NO_3S$.

Вміст $C_2H_7NO_3S$ (2-аміноетансульфонової кислоти) у субстанції має бути не менше 99.0 % і не більше 101.0 %, у перерахунку на суху речовину. Отже, ураховуючи (9.3), $max \Delta_{As} = 1.0$ %.

П.6.2. Чистота субстанції, використовуваної для проведення валідації

Для проведення валідації методики титрування використовували серію № 401107 субстанції таурину, яка відповідала вимогам діючої специфікації. Водночас втрата в масі при висушуванні становила 0.043 %.

Контроль супутніх домішок проводився методом ТШХ. Ніяких/Жодних додаткових плям виявлено не було (тобто вміст домішок менше 0.1 %), тому можна вважати, що виконується вимога (9.5) до чистоти субстанції, яка використовується для проведення валідації титрометричних методик (тобто $\Sigma Im_i \leq 0.32 \times max \Delta_{As} = 0.32$ %). З огляду на це і на незначущу втрату в масі при висушуванні (0.043 %), в подальших розрахунках вміст основної речовини брався рівним 100.0 %.

П.6.3. Стандартизація титранту

Для зменшення невизначеності встановлення титру 0.1 М розчину натрію гідроксиду проводили не за 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої (як у монографії Фармакопеї), а за фармакопейним зразком вихідної стандартної речовини для титрованих розчинів — калію гідрофталатом PO (М.м. = 204.2 у.е.). Водночас близько 0.45 г (точна наважка) калію гідрофталату PO , висушеного до постійної маси, розчиняли в 30 мл води P і титрували 0.1 М розчином натрію гідроксиду (індикатор — 0.1 мл розчин фенолфталеїну $P1$, як для субстанції) до переходу забарвлення. Було отримано середнє з

5 паралельних титрувань. Значення коефіцієнта поправки до номінальної концентрації титрованого розчину $K_T = 1.0159$ з відносним стандартним відхиленням $RSD = 0.11\%$ і довірчим інтервалом $\Delta(\text{titr}) = 0.11\%$. Як видно, витримуються рекомендації розділу 9.2 до збіжності результатів визначення титру ($\leq 0.2\%$).

П.6.4. Номінальний об'єм титрування

$$V_T = \frac{m_T}{K_T \cdot m_{1\text{мл}}} \cdot \left(1 - \frac{LD}{100}\right) = \frac{250}{1.0159 \cdot 12.52} \cdot \left(1 - \frac{0}{100}\right) = 19.66 \text{ мл.} \quad (\text{П.6.1})$$

Номінальний об'єм титрування становить 78.6% від об'єму бюретки місткістю 25 мл, тобто відповідає рекомендаціям розділу 9.2 — близько 80%.

П.6.5. Вплив індикатора

Розчин фенолфталеїну *PI* — це розчин 10 мг/мл фенолфталеїну (М.м. = 318.3 у.е.) у 95% спирті. 0.1 мл цього розчину містить $0.1 \times 10 / 318.3 = 0.00314$ мг-моль фенолфталеїну, на титрування яких піде $0.00314 / (1.0159 \times 0.1) = 0.031$ мл 0.10159 М розчину натрію гідроксиду. Це становить $100 \times 0.031 / 19.7 = 0.16\% \leq 0.32\%$ від номінального об'єму титрування, що незначуще порівнюючи з максимально допустимою невизначеністю методики аналізу $\text{max } \Delta_{As} = 1.0\%$.

П.6.6. Об'єм контрольного досліду

$V_o = 0.37$ мл, що становить 1.9% від номінального об'єму титрування. Така значуща величина V_o спричинена неминучою присутністю у формальдегіді продукту окиснення — мурашиної кислоти.

П.6.7. Наважки для дослідження лінійності

Брали наважки субстанції таурину для різних точок (i) прямої, які становили 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 і 120% від номінальної маси 250 мг. Для дослідження відтворюваності результатів для різних дослідів під час вивчення лінійності брали по 2 наважки для кожної точки (i), позначаючи їх відповідними індексами i_1 і i_2 (див. Табл. П.6.1). Відповідно, отримували 2 набори по 9 точок, які окремо обробляли методом найменших квадратів по прямій. Для порівняння обробляли також об'єднану вибірку з 18 точок, для якої окремо розраховували критерії за принципами, викладеними вище.

П.6.8. Нормалізовані координати

У формулах (9.7) використовували $m_T = 250$ мг і $V_T = 19.66$ мл. Величини X_i , Y_i і Z_i представлені/наведені в Табл. П.6.1.

Таблиця П.6.1

Результати дослідження лінійності в нормалізованих координатах

№ наважки	Наважка таурину, m_i , мг	X, %	V_i , мл	$V_i - V_0$	Y, %	Z, %
80_1	203.6	81.44	16.4	16.03	81.55	100.14
80_2	200.2	80.08	16.05	15.68	79.77	99.62
85_1	210.0	84.00	16.85	16.48	83.84	99.81
85_2	212.5	85.00	17.00	16.63	84.61	99.54
90_1	222.7	89.08	17.77	17.4	88.52	99.38
90_2	224.7	89.88	17.97	17.6	89.54	99.62
95_1	237.4	94.96	18.95	18.58	94.53	99.55
95_2	240.5	96.20	19.19	18.82	95.75	99.53
100_1	245.3	98.12	19.55	19.18	97.58	99.45
100_2	253.8	101.52	20.25	19.88	101.14	99.63
105_1	264.2	105.68	21.05	20.68	105.21	99.56
105_2	263.6	105.44	21.03	20.66	105.11	99.69
110_1	274.0	109.60	21.83	21.46	109.18	99.62
110_2	276.0	110.40	22.00	21.63	110.05	99.68
115_1	287.8	115.12	22.85	22.48	114.37	99.35
115_2	281.0	112.40	22.63	22.26	113.25	100.76
120_1	300.4	120.16	23.95	23.58	119.97	99.84
120_2	301.7	120.68	24.07	23.70	120.58	99.91

П.6.9. Лінійна залежність

Результати обробки по прямій методом найменших квадратів кожного з двох наборів 9 точок наведені в Табл. П.6.2. Критерії взяті з Табл. 9.2 (для субстанцій) і співвідношень (9.9-9.14). Для порівняння обробляли також об'єднану вибірку з 18 точок, для якої окремо розраховували критерії за принципами, викладеними вище.

Таблиця П.6.2

Характеристики лінійної залежності $Y = a + b \times X$

Параметр	Значення	Стандартне відхилення (SD)	Критерій статистичної незначущості ($\leq 0.85 \times SD$)	Критерій практичної прийнятності	Висновок
Набір i_1					
A	0.47	0.64	$ a \leq 0.54$		відпов.
B	0.9915	0.0063			
$ 1 - b $	0.0085	0.0063	$ 1 - b \leq 0.0054$		не відпов.
s_o	0.246			≤ 0.39	відпов.
R	0.99986			≥ 0.99959	відпов.
r^2	0.99973			≥ 0.99917	відпов.
$\delta_{RL, 80}$	0.26			≤ 0.67	відпов.
$\delta_{RL, 120}$	0.46			≤ 0.67	відпов.
ПО		2.1			
ПКО		6.4			
Загальний висновок про лінійність для набору i_1					відпов.
Набір i_2					
a	-1.59	1.02	$ a \leq 0.87$		Не відпов.
b	1.0137	0.0101			
$ 1 - b $	0.0137	0.0101	$ 1 - b \leq 0.0086$		Не відпов.
s_o	0.386			≤ 0.39	Відпов.
r	0.99965			≥ 0.99959	Відпов.
r^2	0.99930			≥ 0.99917	Відпов.
$\delta_{RL, 80}$	0.59			≤ 0.67	Відпов.
$\delta_{RL, 120}$	0.059			≤ 0.67	Відпов.
ПО		3.4			
ПКО		10.2			
Загальний висновок про лінійність для набору i_2					відпов.
Усі 18 точок					
a	-0.54	0.65	$ a \leq 0.51^*$		не відпов.
b	1.0025	0.0064			
$ 1 - b $	0.0025	0.0064	$ 1 - b \leq 0.0050^*$		відпов.
s_o	0.35			≤ 0.39	відпов.
r	0.99967			≥ 0.99959	відпов.
r^2	0.99934			≥ 0.99917	відпов.

Усі 18 точок			Набір i_1			Набір i_2		
81.44	81.55	100.14	81.44	81.55	100.14	80.08	79.77	99.62
80.08	79.77	99.62	84	83.84	99.81	85	84.61	99.54
84	83.84	99.81	89.08	88.52	99.38	89.88	89.54	99.62
85	84.61	99.54	94.96	94.53	99.55	96.2	95.75	99.53
89.08	88.52	99.38	98.12	97.58	99.45	101.52	101.14	99.63
89.88	89.54	99.62	105.68	105.21	99.56	105.44	105.11	99.69
94.96	94.53	99.55	109.6	109.18	99.62	110.4	110.05	99.68
96.2	95.75	99.53	115.12	114.37	99.35	112.4	113.25	100.76
98.12	97.58	99.45	120.16	119.97	99.84	120.68	120.58	99.91
101.52	101.14	99.63						
105.68	105.21	99.56						
105.44	105.11	99.69						
109.6	109.18	99.62						
110.4	110.05	99.68						
115.12	114.37	99.35						
112.4	113.25	100.76						
120.16	119.97	99.84						
120.68	120.58	99.91						
Середнє (\bar{x})	99.70			99.63			99.78	
SD	0.33			0.26			0.38	
$\Delta_R(0.95; 17)$	0.13		$\Delta_R(0.95; 8)$	0.16		$\Delta_R(0.95; 8)$	0.24	
$\delta = \bar{x} - 100 $	0.30			0.37			0.22	
Статистична незначущість систематичної похибки: $\delta \leq \Delta_R$								
<i>Не виконується:</i> 0.30 > 0.13			<i>Не виконується:</i> 0.37 > 0.16			Виконується: 0.22 < 0.24		
Практична незначущість систематичної похибки: $\delta \leq 0.67$								
Виконується: $\Delta = 0.30 \leq 0.67$			Виконується: $\delta = 0.37 \leq 0.67$			Виконується: $\delta = 0.22 \leq 0.67$		
Практична прийнятність прецизійності із 6 повторних титрувань: $\Delta_R(0.95; 5) = t(0.95; f) \times SD / \sqrt{5} \leq 0.33$								
Виконується: 0.25 ≤ 0.33			Виконується: 0.21 ≤ 0.33			Виконується: 0.32 ≤ 0.33		
Загальний висновок про прецизійність і правильність								

відповідає	відповідає	відповідає
-------------------	-------------------	-------------------

Як видно, вимога статистичної незначущості систематичної похибки може як виконуватися (набір i_2), так і не виконуватися (набір i_1 і розширений набір із 18 точок). Практична ж незначущість систематичної похибки виконується для всіх досліджуваних наборів. Виконується і вимога практичної прийнятності прецизійності із 6 повторних титрувань.

Загалом методика відповідає вимогам прецизійності і правильності.