

## Приклад 7

### Валідація методики контролю залишкових кількостей толуолу й ізопропанолу в субстанції фенсукциналу

Проводили валідацію методики газохроматографічного контролю залишкових кількостей толуолу й ізопропанолу в субстанції фенсукциналу, використовуючи стандартизовану процедуру, описану в розділі 10. Відповідно до вимог загальної статті «Залишкові кількості органічних розчинників» (5.4), їх граничні концентрації не мають перевищувати 0.089 % і 0.5 % відповідно.

Використовувані реактиви і посуд відповідали вимогам Фармакопеї.

#### П.7.1. Методика аналізу, що валідується

Умови хроматографування:

- хроматограф «Хром-5» (Чехія) з полуменево-іонізаційним детектором,
- колонка скляна розміром 240 см × 0.3 см, заповнена OV-1, 10 % на «Хроматоні AW DMCS» з розміром частинок 0.20-0.25 мм;
- температура колонки — 80 °С;
- температура випарника — 135 °С;
- температура детектора — 150 °С;
- швидкість газу-носія (аргону) — 30 мл/хв;
- об'єм проби 1 мкл, мікрошприц М-1Н (Росія).

Порядок виходу залишкових розчинників (ЗР): толуол, ізопропанол, диметилсульфоксид (ДМСО).

Хроматографічна система вважається придатною, якщо:

- коефіцієнт симетрії піка, розрахований за піком толуолу із хроматограми розчину порівняння, не перевищує 2.5;
- ступінь розділення піків толуолу й ізопропанолу, розрахований із хроматограм розчину порівняння, становить не менше 3.0;
- відносне стандартне відхилення, розраховане для піків толуолу й ізопропанолу з 5 хроматограм розчину порівняння, не перевищує 9.2 % (див. співвідношення (10.13));
- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком толуолу на хроматограмі розчину порівняння, становить не менше 1500 теоретичних тарілок.

Валідацію методики проводили для аналізу методом стандарту і методом добавок в умовах звичайної (непарофазової) хроматографії. Під час

проведення аналізу поперемінно хроматографували по 1 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння (розчинник — диметилсульфоксид), отримуючи не менше 3 хроматограм. Для перевірки придатності системи спочатку хроматографували 5 разів розчин порівняння. Для перевірки відсутності в субстанції і розчиннику заважальних домішок хроматографували також розчин субстанції (0) і розчинник (00).

### П.7.2. Приготування модельних розчинів і розчинів порівняння

Для приготування модельних розчинів попередньо висушують субстанцію фенсукциналу в сушильній шафі за 105 °С протягом 4 год.

*Розчин порівняння 00:* розчинник (ДМСО).

*Розчин порівняння 0:* у мірну колбу місткістю 10 мл поміщають 1.0 г висушеної субстанції фенсукциналу, розчиняють в ДМСО і доводять до мітки тим самим розчинником.

*Вихідний розчин ЗР.*

А. У зважену мірну колбу місткістю 10 мл поміщають близько 0.088 г (точна наважка  $m_T$ ) толуолу, близько 0.51 г (точна наважка  $m_{IP}$ ) ізопропанолу, доводять ДМСО до мітки і зважують. Знаходять масу розчину А ( $m(A)$ ).

В. У зважену мірну колбу місткістю 25 мл поміщають близько 2.67 г (точна наважка  $m_A(B)$ ) розчину А, доводять ДМСО до мітки і зважують. Знаходять масу розчину В ( $m(B)$ ). Одержаний розчин містить близько 0.8 мг/г толуолу і близько 4.7 мг/г ізопропанолу.

*Модельні розчини.* У мірні колби місткістю 10 мл поміщають зазначені в Табл. П.7.1-П.7.2 наважки ( $m_{B,i}$ ) вихідного розчину В, по 1.0 г висушеної субстанції фенсукциналу, розчиняють і доводять до мітки ДМСО. Модельні розчини для методу стандарту (25, 50, 75, 100 і 125 % в теорії) і методу добавок (25, 75, 125, 175 і 225 % в теорії) готують однаково.

*Розчин порівняння для методу стандарту (MS).* Наважку  $m_{st}(MS)$  розчину В, яка відповідає номінальній концентрації досліджуваних ЗР в модельних розчинах, поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл і доводять ДМСО до мітки.

*Розчин порівняння для методу добавок.* Наважку  $m_{st}(AD)$  розчину В, яка відповідає номінальній концентрації досліджуваних ЗР в модельних розчинах, поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають 1.0 г висушеної субстанції фенсукциналу і доводять ДМСО до мітки.

Нормалізовані концентрації толуолу (Т) і ізопропанолу (ІР) в  $i$ -му модельному розчині розраховували за формулою (див. співвідношення (4.1)):

$$X_{i,T}\% = X_{i,IP}\% = 100 \cdot 10 \cdot (m_{B,i} / m_{st}), \quad (4.33)$$

де  $m_{st}$  — наважка розчину В, взята для приготування відповідного (для методу стандарту або методу добавок) розчину порівняння.

Таблиця П.7.1

Характеристики модельних розчинів для методу стандарту ( $m_T = 0.0874$  г,  $m_{IP} = 0.5177$  г,  $m(A) = 10.6729$  г,  $m_A(B) = 2.6878$  г,  $m(B) = 27.1129$  г)

№ розчину	Маса розчину В, $m_{B, i}$ , г	Маси ОР в 10 мл модельного розчину, мг		Нормалізовані концентрації, $X_i$ , %	
		толуол	ізопропанол	теорія	факт
1	0.2709	0.2298	1.2816	25	24.8
2	0.5446	0.4619	2.5765	50	49.9
3	0.8101	0.6871	3.8331	75	74.2
4	1.0902	0.9247	5.1585	100	99.9
5	1.4169	1.2018	6.7034	125	129.8
<i>St(MS)</i>	1.0913	0.9256	5.1637	—	—

Таблиця П.7.2

Характеристики модельних розчинів для методу добавок ( $m_T = 0.0885$  г,  $m_{IP} = 0.5055$  г,  $m(A) = 10.7611$  г,  $m_A(B) = 2.6659$  г,  $m(B) = 27.3783$  г)

№ розчину	Маса розчину В, $m_{B, i}$ , г	Маси ОР в 10 мл модельного розчину, мг		Нормалізовані концентрації, $X_i$ , %	
		толуол	ізопропанол	теорія	факт
1	0.2728	0.2185	1.2477	25	25.0
2	0.8130	0.6511	3.7183	75	74.4
3	1.3761	1.1020	6.2937	125	125.9
4	1.9184	1.5363	8.7740	175	175.5
5	2.5263	2.0231	11.5543	225	231.1
<i>St(MS)</i>	1.0932	0.8754	4.9999	—	—

### П.7.3. Результати хроматографування

Типова хроматограма розчину порівняння для методу стандарту наведена на Рис. П.7.1.

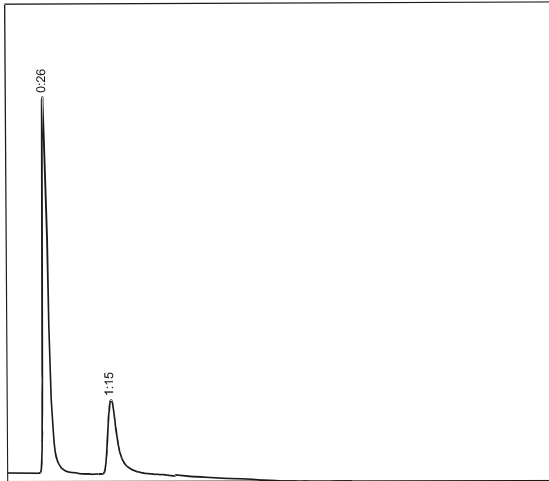


Рисунок П.7.1. Типова хроматограма порівняння для розчину стандарту

У розчиннику (розчин порівняння 00) не були виявлені будь-які заважальні піки (см. Табл. П.7.3-П.7.4), у розчині висушеної субстанції (розчин порівняння 0) були знайдені тільки залишкові піки ізопропанолу (які зменшувалися під час подальшого висушування). Тому зі знайдених для модельних сумішей площ піків ізопропанолу віднімали середню площу піка ізопропанолу в розчині порівняння 0 ( $S_{IP}^0$ ). Аналогічно чинили і для розчину порівняння для методу добавок. Для методу стандарту цю операцію не проводили, оскільки в розчині порівняння для методу стандарту відсутня субстанція.

Нормалізовані значення площ ( $Y_i$ ) толуолу (Т) і ізопропанолу (ІР) розраховували за формулами (див. співвідношення (4.1)):

**Метод стандарту:**

$$Y_{i,T}(MS) = 100 \cdot S_{i,T} / S_{i,T}^{st}(MS),$$

$$Y_{i,IP}(MS) = 100 \cdot (S_{i,IP} - S_{IP}^0) / S_{i,IP}^{st}(MS). \quad (П.7.1)$$

**Метод добавок:**

$$Y_{i,T}(AD)\% = 100 \cdot S_{i,T} / S_{i,T}^{st}(AD),$$

$$Y_{i,IP}(MS)\% = 100 \cdot (S_{i,IP} - S_{IP}^0) / [S_{i,IP}^{st}(AD) - S_{IP}^0]. \quad (П.7.2)$$

Для вираження знайденої концентрації, у відсотках, до введеної розраховували (див. співвідношення (4.1)) величину  $Z$ :

$$Z_i\% = 100 \cdot (Y_i / X_i). \quad (П.7.3)$$

Результати хроматографування досліджуваних об'єктів наведені в Табл. П.7.3, П.7.4. Результати розрахунків представлені в Табл. П.7.6. Критерії розраховані на підставі підходу, описаного в розділі 4.3. Величини  $RSD_{tot}$  розраховували за формулою (10.31), а критичні значення для них — зі співвідношення (10.32).

Розрахунки параметрів лінійної залежності  $Y = b \times X + a$  проводили методом найменших квадратів. Результати розрахунків — величини  $b$ ,  $s_b$ ,  $a$ ,  $s_a$ ,  $SD_o$  (залишкове стандартне відхилення) і  $R_c$  (коефіцієнт кореляції) — представлені в Табл. П.7.5, одержана в нормалізованих координатах пряма — на Рис. П.7.2.

Таблиця П.7.3

Результати хроматографування модельних розчинів методом стандарту

Номер модельного розчину	Площі піків толуолу	Середня площа, $S_{i,T}$ ( $RSD_i$ , %)	$Y_{i,T}$ , %	Площі піків ізопропанолу	Середня площа, $S_{i,IP}$ ( $RSD_i$ , %)	$S_{i,IP} - S_{IP}^0$	$Y_{i,IP}$ , %
1	93.2 96.1 95.3 94.2	94.7 1.3 %	24.1	306.8 286.4 296.4 289.6	294.8 3.1 %	240.3	24.3
2	286.0 304.3 268.9	286.4 6.2 %	73.0	795.7 732.0 801.8	776.5 5.0 %	722.0	73.0
3	486.4 469.0 504.5	486.6 3.6 %	124.0	1277.9 1295.3 1310.8	1294.7 1.3 %	1240.2	125.3
4	671.6 691.4 704.5	689.2 2.4 %	175.6	1913.1 1807.5 1754.2	1824.9 4.4 %	1770.4	178.9
5	894.8 945.2 828.4	889.5 6.6 %	226.6	2527.1 2306.2 2245.1	2359.5 6.3 %	2305.0	232.9
$st(MS)$	370.8 426.3 392.4 380.4	392.5 6.2 %	—	1104.1 1065.1 1003.9 1002.9	1044.0 4.7 %	989.5	—
Розчин порівняння $00 (S_{00})$	0			0			
Розчин порівняння	0 0			54.2 55.2	54.5 1.2 %		

ня $0 (S_0)$	0			54.0			
Об'єднане $RSD_{tot}, \%$		<b>1.8</b> ( $f_{tot} = 13$ )			<b>2.9</b> ( $f_{tot} = 15$ )		
Критичне значення $RSD_{tot}, \%$		<b>8.0</b>			<b>8.3</b>		

Таблиця П.7.4

Результати хроматографування модельних розчинів методом добавок

Номер модельного розчину	Площі піків толуолу	Середня площа, $S_{i,T}$ ( $RSD_i, \%$ )	$Y_{i,T}, \%$	Площі піків ізопропанолу	Середня площа, $S_{i,IP}$ ( $RSD_i, \%$ )	$S_{i,IP} - S_{IP}^0$	$Y_{i,IP}, \%$
1	93.2 96.1 95.3 94.2	94.7 1.3 %	24.1	306.8 286.4 296.4 289.6	294.8 3.1 %	240.3	24.3
2	286.0 304.3 268.9	286.4 6.2 %	73.0	795.7 732.0 801.8	776.5 5.0 %	722.0	73.0
3	486.4 469.0 504.5	486.6 3.6 %	124.0	1277.9 1295.3 1310.8	1294.7 1.3 %	1240.2	125.3
4	671.6 691.4 704.5	689.2 2.4 %	175.6	1913.1 1807.5 1754.2	1824.9 4.4 %	1770.4	178.9
5	894.8 945.2 828.4	889.5 6.6 %	226.6	2527.1 2306.2 2245.1	2359.5 6.3 %	2305.0	232.9
$st(AD)$	370.8 426.3 392.4 380.4	392.5 6.2 %	—	1104.1 1065.1 1003.9 1002.9	1044.0 4.7 %	989.5	—
Розчин порівняння $00 (S_{00})$	0			0			
Розчин порівняння	0 0			54.2 55.2	54.5 1.2 %		

ня $0 (S_0)$	0			54.0			
Об'єднане $RSD_{tot}, \%$	<b>4.8</b> ( $f_{tot} = 14$ )				<b>3.4</b> ( $f_{tot} = 16$ )		
Критичне значення $RSD_{tot}, \%$	<b>8.2</b>				<b>8.4</b>		

## П.7.4. Результати і їх обговорення

### П.7.4.1. Збіжність паралельних інжекцій

Як видно з Табл. П.7.3, П.7.4, відносні стандартні відхилення повторних інжекцій  $RSD_i$  площ піків толуолу й ізопропанолу для всіх модельних розчинів відповідають вимогам (10.13), тобто не перевищують 6.7 % і 8.3 % для числа ступенів свободи  $f = 2$  і 3 відповідно. Об'єднане стандартне відхилення  $RSD_{tot}$  також не перевищує критичних значень співвідношення (10.32). Тому вимоги (10.10, 10.13) придатності хроматографічної системи за показником «відносне стандартне відхилення» можна вважати обґрунтованими.

### П.7.4.2. Специфічність

На хроматограмі розчинника (*розчин порівняння 00*) не спостерігалися піки з часом утримування, які співпадають (або близькі) з часом утримування піків толуолу й ізопропанолу.

На хроматограмі *розчину порівняння 0* спостерігався пік, який співпадав за часом утримання з піком ізопропанолу. Його площа ( $S_{IP}^0 = 54.5$ ) становить 5.2 % від площі піка ізопропанолу в *розчині порівняння для методу добавок*, що перевищує вимоги (10.20) ( $\leq 5.1$  %). Однак площа цього піка зменшувалася під час подальшого висушування, тому можна вважати, він є піком ізопропанолу, який не повністю видалився під час висушування. Тому під час обробки результатів площа цього піка віднімалася з площ піків ізопропанолу всіх модельних розчинів і *розчину порівняння для методу добавок*, крім *розчину порівняння для методу стандарту*.

Ступінь розділення піків на всіх досліджуваних хроматограмах перевищував 5.5, що відповідає вимогам придатності системи ( $R_s > 3.0$ ).

Ефективність колонки за піком толуолу на всіх хроматограмах і колонках перевищувала 1500 т.т. Оскільки водночас спостерігалися задовільні метрологічні характеристики, то ця величина і пропонується для введення у випробування на придатність системи.

Отже, специфічність методики можна вважати підтверженою.

### П.7.4.3. Лінійність і межа виявлення

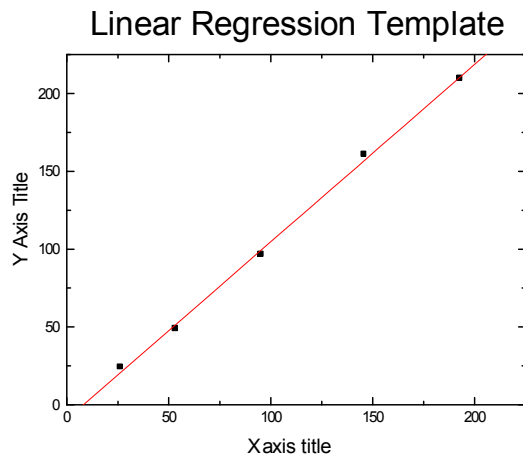


Рисунок П.7.2. Лінійна регресія для толуолу в нормалізованих координатах

Таблиця П.7.5

Результати обробки величин  $X_{ij}$  і  $Y_{ij}$  методом найменших квадратів по прямій  
 $Y = b \times X + a$  (толуол — Т, ізопропанол — ІР)

ЗР	$a$	$s_a$	2.353 $\times s_a$	Практ. незн. $a$	$DL$ $\leq$ 32 %	$b$	$s_b$	$SD_o$ $\leq 6.8$	$R_c \geq$ 0.9851
Метод стандарту									
Т	0.70	3.48	8.19	2.6	12.0	0.961	0.041	3.41	0.9972
ІР	4.30	4.00	9.41	2.6	14.1	1.004	0.048	3.91	0.9966
ОР	$a$	$s_a$	2.353 $\times s_a$	Практ. незн. $a$	$DL$ $\leq$ 32 %	$b$	$s_b$	$SD_o$ $\leq 6.8$	$R_c \geq$ 0.9963
Метод добавок									
Т	-0.27	1.50	3.53	6.8	5.0	0.989	0.010	1.67	0.9998
ІР	-1.90	1.36	3.20	6.8	4.4	1.019	0.009	1.52	0.9999

Як видно з Табл. 4.5, лінійність виконується для обох залишкових розчинників.

Слід відзначити, що, як показано в розділі 10.7.2.2, вимоги практичної незначущості вільного члена ( $\leq 2.6\%$ ) є безглуздими у випадку методу добавок.

Межа виявлення для обох залишкових розчинників задовольняє критерій (10.17) ( $\leq 32\%$ ).



#### П.7.4.4. Правильність і прецизійність

Таблиця П.7.6

Перевірка правильності і прецизійності

№	Метод стандарту					Метод добавок				
	$X_i$	$Y_i(T)$	$Y_i(IP)$	$Z_i(T)$	$Z_i(IP)$	$X_i$	$Y_i(T)$	$Y_i(IP)$	$Z_i(T)$	$Z_i(IP)$
1	24.8	23.3	25.6	94.0	103.2	25.0	24.1	24.3	96.4	97,2
2	49.9	47.8	51.6	95.8	103.4	74.4	73.0	73.0	98.8	98,3
3	74.2	74.4	75.5	100.3	101.8	125.9	124.0	125.3	99.1	99,5
4	99.9	101.3	103.3	101.4	103.4	175.5	175.6	178.9	100.1	101.9
5	129.8	122.7	125.2	94.5	96.5	231.1	226.6	232.9	96.8	100.8
Середнє, $\bar{Z}$ , %				97.2	101.7				98.2	99.54
$SD$ , %				3.5	2.9				1.58	1.88
$t(95\%, 3)$				2.13	2.13				2.13	2.13
$\Delta_{Im} (\leq 16\%)$				7.5	6.2				3.37	4.00
Систематична похибка $\delta =  \bar{Z} - 100 $				2.8	1.7				1.8	0.5
$\Delta_{Im}/\sqrt{5}$				3.3	2.8				1.51	1.8
$max \delta$				5.1	5.1				5.1	5.1
Незначущість $\delta$ :										
(а) $\delta \leq \Delta_{Im} / \sqrt{5}$ ;				так	так				ні	так
(б) якщо не виконується										
(а), то $\delta \leq max \delta = 5.1$				<b>так</b>	<b>так</b>				<b>так</b>	<b>так</b>

Як видно з Табл. П.7.6, збіжність результатів задовольняє вимоги (10.14) для обох залишкових розчинників. Систематична похибка (правильність) ЗР задовольняє вимоги статистичної і практичної незначущості (див. розділ 4.4.3.3) для обох ЗР для методу стандарту. У випадку методу добавок систематична похибка є значущою статистично для толуолу, але незначущою практично. Для ізопропанолу систематична похибка є незначущою статистично і практично.

Отже, точність задовольняє необхідні вимоги для обох залишкових розчинників і обох підходів.

Крім того, як показано в розділі 10.9.1, виконання вимог із лінійності, прецизійності і правильності є також підтвердженням достатньої стабільності розчинів для контролю ЗР за специфікацією.