

6. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ У ВАРІАНТІ КАЛІБРУВАЛЬНОГО ГРАФІКА

У деяких випадках під час проведення кількісного визначення доводиться стикатися з відсутністю прямої пропорційності аналітичного сигналу від концентрації. Типовим прикладом таких методик є методики атомно-абсорбційної спектрофотометрії (ААС), де часто відсутня пряма пропорційність оптичної густини від концентрації в аналітичному діапазоні.

Це призводить до необхідності використовувати метод калібрувального графіка (МКГ) замість методу стандарту (МС).

Валідація методик, що використовують калібрувальний графік, має свою специфіку, яка відрізняється від методу стандарту, який розглянутий у попередніх розділах.

Далі розглядається стандартизована процедура валідації методик кількісного визначення у варіанті МКГ. Паралельно аналізуються критерії можливого застосування до цих методик більш простого методу стандарту з відповідною валідацією за розробленими раніше схемами. Розгляд проводиться на прикладі ААС-методик, але отримані висновки і результати застосовні до будь-яких методик, що використовують метод калібрувального графіка.

6.1. Загальні зауваження

Мета валідації аналітичної методики — це експериментальний доказ того, що методика придатна для розв'язання поставлених завдань. Тому валідацію необхідно проводити за тих самих умов, що й саму методику.

Ураховуючи, що метод калібрувального графіка (МКГ) має більш загальний характер, ніж метод стандарту (МС), на стадії побудови калібрувальної прямої (4.2) також доцільно перевірити можливість використання для аналізу замість МКГ більш простого МС. Як показано (див. розділ 4.4), у тому разі коли вільний член a калібрувальної прямої (4.2) значуще не відрізняється від нуля (критерії статистичної і практичної незначущості описані раніше (див. розділ 4.4)), застосовний метод стандарту. Валідація таких методик у цьому разі нічим не відрізняється від інших методик у варіанті МС, наприклад спектрофотометрії (див. розділ 4).

У результаті проведення валідації також мають бути розроблені вимоги до придатності системи, які дозволяють оцінити за рутинного аналізу, чи відповідають поточні умови тим, що були під час проведення валідації.

6.2. Калібрувальна пряма

Для методик ААС часто доводиться рахуватися з вузьким інтервалом лінійного діапазону, а також із тим, що калібрувальна пряма може значуще (статистично або практично) не проходити через початок координат. У цьому разі метод стандарту (МС) не може бути застосовний, і необхідно

використовувати метод калібрувального графіка (МКГ). Концентрація компонента, що аналізується (C), у досліджуваному розчині знаходиться за такої умови за вимірної абсорбції (A) з рівняння калібрувальної прямої, яка може бути записана як через вихідні концентрації (C), так і через нормалізовані координати — X (у % до номінальної концентрації) і Y (у % до номінальної абсорбції):

$$X = b \times Y + a. \quad (6.1a)$$

$$X = b_1 \times A + a_1. \quad (6.1b)$$

$$C = b_2 \times A + a_2. \quad (6.1c)$$

Як вже зазначалося вище, стандартизована процедура валідації методик контролю якості ЛЗ (див. розділи 4-5) розроблена саме для МС. Застосування її до МКГ потребує відповідного коригування.

У МС проводиться паралельне вимірювання оптичних густин випробовуваного і стандартного розчинів. Ці розчини є повністю рівноцінними, і невизначеність вимірювання їх оптичних густин передбачається однаковою. Розрахунок концентрації у випробовуваному розчині проводиться з простої пропорції. Прогноз повної невизначеності методики проводиться виходячи з огляду на вимоги до збіжності результатів кінцевої аналітичної операції і метрологічні вимоги до мірного посуду і ваг (невизначеність пробопідготовки).

У МКГ, паралельно випробовуваному розчину, проводиться вимірювання абсорбцій декількох стандартних розчинів, за якими будується калібрувальна пряма (6.1). Невизначеність визначення концентрації випробовуваного розчину за рівнянням (6.1) містить невизначеність вимірювання оптичної густини випробовуваного розчину і невизначеність самої калібрувальної прямої (6.1). Невизначеність калібрування не прогнозується (як у методі стандарту), а прямо розраховується за метрологічними характеристиками калібрувальної прямої (6.1) і пов'язана як з невизначеністю оптичної густини калібрувальних розчинів (включно з кінцевою аналітичною операцією і пробопідготовкою), так і з відхиленнями від лінійності.

Як міра оцінки невизначеності калібрувальної прямої (6.1) можуть бути застосовні різні величини, зокрема невизначеності коефіцієнтів a і b . Однак більш коректним оцінюванням невизначеності калібрування видається залишкове стандартне відхилення SD_{rest} . Дійсно, якщо калібрувальні розчини отримані і виміряні за тих самих умов, що й випробовуваний розчин, то точка, яка відповідає випробовуваному розчину, належить тій самій генеральній сукупності, що й калібрувальні розчини, і тому його невизначеність може бути описана за допомогою SD_{rest} .

Такий самий підхід застосовується і в стандартизованій процедурі валідації методик у варіанті методу стандарту (див. розділи 4-5).

6.3. Кількість точок калібрувального графіка

Як вже зазначалося вище, особливість застосування МКГ полягає в тому, що загальна невизначеність отриманих результатів визначення концентрації аналіту (Δ_{As}) залежить не тільки від невизначеності (з урахуванням пробопідготовки) отриманого для нього аналітичного сигналу (у разі ААС — абсорбції), але й від невизначеності самого калібрувального графіка. Це означає, що необхідно встановлювати критерії коректності отриманих результатів вимірювання аналітичного сигналу як для аналіту, так і для параметрів калібрувального графіка.

Загалом калібрувальний графік має будуватися кожен раз разом з аналізом випробовуваного розчину (так зазвичай і роблять в ААС). Ті випадки, коли той самий калібрувальний графік може використовуватися в тій самій лабораторії протягом декількох днів (тижнів, місяців), мають кожного разу окремо обґрунтовуватися. Таке обґрунтування, власне, виходить за межі валідації методик у МКГ.

Отже, у МКГ доводиться зважати на необхідність побудови калібрувального графіка кожного разу, що суттєво подовжує аналіз порівнюючи з МС. Тому перевірка лінійності і побудова калібрувальної прямої за 9 точками (плюс 1 стандарт), як це заведено під час валідації в МС (див. розділи 4-5), в ААС у варіанті МКГ є нереалістичними на практиці.

Часто рекомендується використовувати для побудови калібрувальної прямої $n = 4$ точки. Однак у цьому разі калібрувальна пряма має всього $\nu = 4 - 2 = 2$ ступенів свободи і односторонній коефіцієнт Стюдента 2.92. Тому доцільно підвищити число точок до $n = 5$. Це дозволяє знизити коефіцієнт Стюдента до 2.35, що суттєво знижує невизначеність калібрувальної прямої, а отже, і невизначеність усієї методики аналізу.

6.4. Нормалізовані координати

Вимоги до валідаційних характеристик простіше отримувати в нормалізованих координатах, оскільки в цьому разі вони не залежать від специфіки конкретного об'єкта, а тільки від допусків вмісту і діапазону (див. розділи 4-5).

У МС (див. розділ 4.1) перехід до нормалізованих координат здійснюється шляхом ділення концентрації і аналітичного сигналу розчину препарату на концентрацію і аналітичний сигнал стандартного розчину. У МКГ замість стандартного розчину може бути використаний калібрувальний розчин із номінальною концентрацією C_{nom} і відповідною йому номінальною оптичною густиною A_{nom} . У цьому разі рівняння для нормалізованих координат будуть мати такий самий вигляд, що й для МС (див. розділ 4.1):

$$\begin{aligned}
 X_i (\%) &= 100 \times C_i / C_{st} \cdot C_{st} = C_{nom} \\
 Y_i (\%) &= 100 \times A_i / A_{st} \cdot A_{st} = A_{nom} \\
 Z_i (\%) &= 100 \times Y_i / X_i
 \end{aligned}
 \tag{6.2}$$

Однак застосування нормалізований координат у МКГ далеко не так ефективно, як у МС.

Зазначимо, що самі величини Y потрібні тільки для побудови калібрувального графіка в наочних нормалізованих координатах. Для отримання коефіцієнта кореляції, діапазону, залишкового стандартного відхилення і вимог до правильності і прецизійності використовуються тільки величини X . Значно більш важливим, як порівняти з Y , для отримання валідаційних характеристик є ступінь витягнення RR :

$$RR (\%) = (\text{уведено/знайдено}) \times 100, \tag{6.3}$$

Який у МС співпадає з величиною $Z_i = 100 \times Y_i / X_i$. Однак неважко побачити, що в МКГ $RR_i \neq Z_i$, оскільки в цьому разі, на відміну від МС, $A_i \times C_{nom} / A_{nom} \neq C_i$ (знайдено). Отже:

метод стандарту: $Z = RR;$ (6.4)

метод калібрувального графіка: $Z \neq RR.$ (6.5)

Ураховуючи (6.5), у МКГ достатньо використовувати тільки нормалізовану величину X , розраховану за співвідношенням (6.2). Калібрувальна пряма (6.1b) у цьому разі будується в координатах $X - A$, а ступінь витягнення RR знаходиться за співвідношенням (6.3). Однак використання повних нормалізованих координат, тобто побудова прямої (6.1a) у координатах $X - Y$, дозволяє, як це буде показано нижче, оцінити з тих самих експериментальних даних також і застосовність значно простішого МС для конкретної методики ААС. Тому надалі ми будемо використовувати повні нормалізовані координати (6.2) і пряму (6.1a).

6.5. Діапазон дослідження лінійності

Зазвичай для ААС-методик діапазон для кількісного визначення має бути не вужче 70-130 % від номінального значення. З огляду на те, що ця методика може застосовуватися для контролю розчинення, діапазон можна розширити до 50-150 % від номінального вмісту. У деяких випадках (для вузьких допусків вмісту) можна використовувати і «стандартний» діапазон (див. розділ 1) 80-120 %.

З урахуванням кількості точок калібрувального графіка $n = 5$, в Табл. 6.1 наведені рекомендовані концентрації розчинів (у % до номінальної концентрації 4 ppm) для побудови калібрувальної прямої в МКГ для різних

аналітичних діапазонів, а також стандартні відхилення SD_{Co} , які їм відповідають. У Табл. 6.2 наведені рекомендовані концентрації (у % до номінальної концентрації) для $n = 9$ модельних розчинів, які використовуються і в методі стандарту (МС) для перевірки лінійності, а також стандартні відхилення SD_{Co} , які їм відповідають.

Таблиця 6.1

Рекомендовані концентрації розчинів (у % до номінальної концентрації) для побудови калібрувального графіка в МКГ, число точок (n) прямої і відповідне йому число ступенів свободи (ν), рекомендовані концентрації модельних сумішей (які використовуються також для перевірки лінійності в МС), а також стандартні відхилення SD_{Co} , які їм відповідають

№	МКГ			Модельні суміші в МС		
	80-120 %	70-130 %	50-150 %	80-120 %	70-130 %	50-150 %
1.	80.0	70.0	50.0	80.0	70.0	50.0
2.	90.0	85.0	75.0	85.0	77.5	62.5
3.	100.0	100.0	100.0	90.0	85.0	75.0
4.	110.0	115.0	125.0	95.0	92.5	87.5
5.	120.0	130.0	150.0	100.0	100.0	100.0
6.				105.0	107.5	112.5
7.				110.0	115.0	125.0
8.				115.0	122.5	137.5
9.				120.0	130.0	150.0
n	5			9		
ν	3			7		
SD_{Co}	15.81	23.72	39.53	13.69	20.54	34.23

6.6. Повна невизначеність методики і її складові

Метод ААС у фармакопейному аналізі застосовується для кількісного визначення тільки готових лікарських засобів (ГЛЗ). У разі контролю домішок метод ААС застосовується також і для субстанцій, однак у цьому **разі** їх аналіз нічим формально не відрізняється від аналізу ГЛЗ. Тому подальший розгляд проводиться тільки для ГЛЗ.

Як було показано раніше (див. розділ 4), повна відносна невизначеність визначення концентрації Δ_{As} не має перевищувати максимально допустимого значення $\max \Delta_{As}$, яке в разі аналізу ГЛЗ знаходиться за співвідношенням:

$$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.32 \times B. \quad (6.6)$$

Тут B — півширина допусків (полусума верхньої і нижньої меж) вмісту компонента лікарського засобу, що аналізується, у відсотках до номінального вмісту.

Повна невизначеність методики ААС-аналізу Δ_{As} містить декілька складових.

1. Систематична похибка δ_l , яка викликана матричними ефектами (тобто впливом плацебо). Величина δ_l характеризує специфічність методики (див. нижче) як для МС, так і для МКГ і має бути незначущою порівнюючи з максимально допустимою повною невизначеністю методики аналізу $\max \Delta_{As}$, тобто, ураховуючи (6.6):

$$\delta_l \leq \max \delta_l = 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.10 \times B. \quad (6.7)$$

Величина δ_l може бути, у принципі, зменшена до прийняттого рівня зміненням процедури власне аналізу, наприклад шляхом уведення плацебо в стандартний або калібрувальні розчини.

2. Невизначеність калібрування (Δ_{cal}). Характерною особливістю невизначеності калібрування Δ_{cal} є те, що її неможливо зменшити під час виконання власне аналізу, не змінюючи процедури калібрування і/або аналітичного діапазону. Джерела виникнення невизначеності калібрування Δ_{cal} суттєво різняться для МС і МКГ. Величина Δ_{cal} може бути оцінена і регламентована під час дослідження лінійності (МС, див. розділи 4.3-4.4) або під час побудови калібрувальної прямої (МКГ).
3. Випадкова складова невизначеності, яка пов'язана безпосередньо з аналізом випробовуваного розчину (МКГ) або з аналізом випробовуваного і стандартного розчинів (МС). Ця складова невизначеності містить невизначеність як кінцевої аналітичної операції (вимірювання оптичної густини), так і пробопідготовки. Остання у разі багаторазових розведень розчинів, що аналізуються, може значно перевищувати невизначеність кінцевої аналітичної операції. Неважко побачити, що в МС ця випадкова складова невизначеності приблизно в $\sqrt{2}$ раз більше, ніж у методі калібрувального графіка або в методі питомого показника поглинання. Випадкова складова може бути зменшена під час виконання власне аналізу шляхом збільшення числа/кількості паралельних визначень (включно з наважкою).

6.7. Критерії специфічності методики

Критерії специфічності методики однакові для МС і МКГ і такі самі, як і для методу спектрофотометрії (див. розділ 4.4.6.2). Оптичні густини контрольного розчину (A_{blank}) і розчину плацебо ($A_{placebo}$) не мають значущого впливати на ухвалення рішень про якість зразка, що аналізується. Тому їх частка в загальній оптичній густині (A_{nom}) зразка номінального складу має

бути незначущою порівнюючи з максимально допустимою повною невизначеністю методики аналізу $\max \Delta_{As}$, тобто, з урахуванням (6.6-6.7):

$$\begin{aligned} 100 \times (A_{blank} / A_{nom}) &\leq \max \delta_1 = 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.10 \times B. \\ 100 \times (A_{placebo} / A_{nom}) &\leq \max \delta_1 = 0.10 \times B. \end{aligned} \quad (6.8)$$

6.8. Валідаційні критерії в методі стандарту

Це питання докладно розглянуто в розділі 4. Характерною особливістю валідації методик у варіанті МС є те, що більшість валідаційних характеристик знаходиться під час дослідження лінійності на 9 модельних сумішах.

У МС невизначеність калібрування Δ_{cal} пов'язана зі значущістю (статистичною або практичною) вільного члена a калібрувальної прямої (6.1a) і має систематичний характер. Ураховуючи загальні аналітичні вимоги щодо максимального зниження систематичної похибки, доцільно вимагати, щоб систематична похибка калібрування Δ_{cal} у МС була незначущою порівнюючи з максимально допустимою повною невизначеністю методики аналізу $\max \Delta_{As}$, тобто, ураховуючи (6.6) (див. розділ 4):

метод стандарту:

$$\Delta_{cal} = \delta_2 \leq \max \delta_2 = 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.10 \times B. \quad (6.9)$$

Для номінальної концентрації (тобто $X = 100\%$) $\delta_2 = 0$, досягаючи максимальних значень на межах аналітичного діапазону концентрацій (X_{min} і X_{max}). Як показано для МС (див. розділ 4), для того щоб величина δ_2 для всіх точок аналітичного діапазону не перевищувала максимально допустимого значення $\max \delta_2$ зі співвідношення (6.8), вільний член a рівняння (6.1a) має витримувати вимогу, яка для аналізу ГЛЗ має вигляд:

метод стандарту:

$$a \leq \frac{0.10 \times B}{1 - (X_{min} / 100)}. \quad (6.10)$$

Характерною особливістю систематичної похибки δ_2 , пов'язаною зі співвідношенням (6.10), є її передбачуваність — вона повністю визначається вільним членом a співвідношення (6.1a) і не може бути зменшена у варіанті МС без зменшення величини a або без звуження аналітичного діапазону (тобто величини X_{min}). Тому вимога (6.9) незначущості величини δ_2 узгоджується в МС зі звичайною аналітичною практикою, яка вимагає виключення систематичної похибки.

Слід зазначити, що систематична похибка δ_2 , яка пов'язана зі співвідношенням (6.10), має різний знак на кінцях аналітичного діапазону. Тому середня величина ступеня витягнення RR (6.3) для модельних сумішей, розподілених по всьому діапазону, може бути дуже близькою до 100% і не

мати значущої систематичної похибки. Тобто середнє значення величини $(100 - RR)$ для модельних сумішей не може виявити систематичну похибку, яка пов'язана з нерівністю нулю вільного члена a в МС. Її регламентує співвідношення (6.10). Середній ступінь витягнення під час аналізу модельних сумішей за допомогою МС не повинен мати значущої систематичної похибки, тобто для нього має виконуватися співвідношення (6.7).

У разі МС критерій (6.10) перевіряється на стадії аналізу 9 модельних сумішей ($\nu = 7$, Табл. 6.1) (див. розділ 4). Формально він може бути перевірений також на стадії побудови калібрувального графіка за 5 точками у МКГ. Однак через мале число ступенів свободи ($\nu = 3$, Табл. 6.1) невизначеність вільного члена a за такої умови може бути занадто велика, і перевірити критерій (6.10) стає неможливим.

Оскільки систематична похибка в МС є незначущою, то повна невизначеність методики Δ_{As} співпадає з випадковою невизначеністю аналізу модельних сумішей Δ_{sample} , тобто:

$$\text{МС:} \quad \Delta_{sample} \leq \max \Delta_{sample} \approx \max \Delta_{As} = 0.32 \times B. \quad (6.11)$$

Ураховуючи також, що в разі МС $\nu = 7$ (Табл. 6.1), отримаємо:

$$\text{МС:} \quad \Delta_{sample} = t(0.95; 7) \times SD_{rest} = 1.89 \times SD_{rest}. \quad (6.12)$$

Із (6.11-6.12) отримаємо вимоги до залишкового стандартного відхилення SD_{rest} :

$$\text{МС:} \quad SD_{rest} \leq \max \Delta_{As} / 1.89. \quad (6.13)$$

Підставляючи (6.13) у рівняння (4.5), отримаємо вимоги до мінімально допустимого коефіцієнта кореляції прямої, побудованої за 9 модельними сумішами.

Підсумкові вимоги до валідаційних характеристик МС наведені в Табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Валідаційні критерії для методу стандарту (аналіз 9 модельних сумішей)

$B, \%$	$\max \Delta_{As} =$ $\max \Delta_{sample}, \%$	$\max \delta_1, \%$	$\max \delta_2, \%$	$SD_{rest}, \%$	$\min R_c^2$	$\max a, \%$
<i>Діапазон 80-120 %</i>						
5.0	1.6	0.50	0.50	0.84	0.99620	2.50
7.5	2.4	0.75	0.75	1.27	0.99144	3.75
10.0	3.2	1.00	1.00	1.69	0.98478	5.00
12.2	3.9	1.22	1.22	2.06	0.97735	6.10
15.0	4.8	1.50	1.50	2.53	0.96577	7.50

20.0	6.4	2.00	2.00	3.38	0.93914	10.0
<i>Діапазон 70-130 %</i>						
5.0	1.6	0.50	0.50	0.84	0.99831	1.67
7.5	2.4	0.75	0.75	1.27	0.99620	2.50
10.0	3.2	1.00	1.00	1.69	0.99324	3.33
12.2	3.9	1.22	1.22	2.06	0.98994	4.07
15.0	4.8	1.50	1.50	2.53	0.98478	5.00
20.0	6.4	2.00	2.00	3.38	0.97295	6.67
<i>Діапазон 50-150 %</i>						
5.0	1.6	0.50	0.50	0.84	0.99939	1.00
7.5	2.4	0.75	0.75	1.27	0.99863	1.50
10.0	3.2	1.00	1.00	1.69	0.99757	2.00
12.2	3.9	1.22	1.22	2.06	0.99638	2.44
15.0	4.8	1.50	1.50	2.53	0.99452	3.00
20.0	6.4	2.00	2.00	3.38	0.99512	4.00

6.9. Валідаційні критерії в методі калібрувального графіка

На відміну від МС, у МКГ лінійність перевіряється не на стадії аналізу 9 модельних сумішей, а вже на стадії побудови калібрувальної прямої (за 5 точками — див. вище). Критерії лінійності калібрувальної прямої є одночасно і критеріями придатності системи. У разі їх невиконання аналіз зразків проводити не можна.

У МКГ невизначеність калібрування Δ_{cal} пов'язана з невизначеністю параметрів калібрувального графіка. Величина Δ_{cal} пов'язана як з невизначеністю абсорбції калібрувальних розчинів (випадкова складова), так і з відхиленнями від лінійності. Останні мають систематичний характер для кожної концентрації, але випадковий для всієї прямої (оскільки опрацювання прямої проводиться методом найменших квадратів). Тому, якщо калібрувальна пряма будується для кожного аналізу (а саме такий випадок ми й розглядаємо), то можна вважати, що невизначеність калібрування в МКГ має випадковий характер.

З параметрів калібрувального графіка в МКГ ми можемо оцінити довірчий інтервал Δ_{cal} за якоїсь ймовірності, який формально нічим не відрізняється від довірчого інтервалу збіжності для випробовуваного розчину. Тому вимога незначущості величини Δ_{cal} порівнюючи з повною невизначеністю методики аналізу Δ_{As} у МКГ може виявитися занадто жорсткою. Ураховуючи це, регламентація величини Δ_{cal} у МКГ, на відміну від МС, не так однозначна, і тут можуть бути запропоновані різні підходи, які розглядаються нижче.

Однією з особливостей валідації методик у МКГ є те, що тут неможливо отримати висновок про невизначеність методики на підставі результатів дослідження тільки лінійності (як це проводилося під час валідації методик у

МС — див. розділи 4-5). Результати досліджень лінійності калібрувальної прямої характеризують лише невизначеність калібрування Δ_{cal} і можуть бути використані під час формування критеріїв придатності системи.

Повна невизначеність результатів аналізу (зокрема, модельних сумішей) (Δ_{As}) визначається декількома факторами, серед яких головними є:

- Невизначеність, яка пов'язана з калібрувальною прямою (Δ_{cal}); вона спричинена невизначеністю параметрів a і b калібрувальної прямої (6.1a). Характеристикою цієї невизначеності є залишкове стандартне відхилення SD_{rest} , якому відповідає довірчий інтервал, аналогічний (6.12) для МС, але з числом ступенів свободи $\nu = 3$ (див. Табл. 6.1):

$$МКТ: \quad \Delta_{cal} = t(0.95; 3) \times SD_{rest} = 2.35 \times SD_{rest}. \quad (6.14)$$

Величина Δ_{cal} характеризує невизначеність калібрування ААС-методики і не має перевищувати максимально допустиме значення $max \Delta_{cal}$.

Зі співвідношення (6.14) можна отримати аналогічне (6.13) рівняння для SD_{rest} 5-точкової прямої:

$$SD_{rest} = \Delta_{cal} / 2.35. \quad (6.15)$$

- Невизначеність, яка спричинена самим випробовуваним розчином (Δ_{sample}), тобто невизначеністю вимірювання його абсорбції A і невизначеністю його пробопідготовки. Величина Δ_{sample} може бути знайдена в процесі валідації під час аналізу модельних сумішей і розрахунків їх концентрацій за калібрувальною прямою (6.1a).

У разі виконання вимог специфічності (6.8), величина Δ_{sample} характеризує збіжність результатів (тобто випадкову складову невизначеності) ААС-методики.

З урахуванням цього, повну невизначеність визначення концентрації Δ_{As} можна записати як:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{cal}^2 + \Delta_{sample}^2} \leq \max \Delta_{As}. \quad (6.16)$$

Під час проведення аналізу тільки одного зразка (за методикою) і розрахунку його концентрації за калібрувальною прямою (6.1a) ми можемо оцінити тільки невизначеність калібрування Δ_{cal} (з огляду на метрологічні характеристики калібрувального графіка), фактична ж величина Δ_{sample} нам невідома. Вона може бути оцінена на підставі результатів аналізу модельних сумішей у процесі проведення валідації.

Отже, для коректного проведення валідації нам необхідно надати якісь критерії прийнятності до співвідношення величин Δ_{cal} і Δ_{sample} .

Зі співвідношення (6.6) видно, що ми маємо критерій тільки для сумарної величини Δ_{As} , тому необхідні якісь вихідні припущення (котрі мають бути підтверджені експериментально) для однієї з величин — Δ_{cal} або Δ_{sample} . Доцільно ці припущення висунути до Δ_{cal} , оскільки ця величина завжди буде знаходитися під час побудови калібрувальної прямої, і тому припущення завжди будуть перевірятися під час перевірки придатності системи.

Для розробки критеріїв прийнятності величини Δ_{cal} у МКГ можна запропонувати 2 підходи, які ґрунтуються на різних припущеннях.

6.9.1. Підхід 1: припущення незначущості невизначеності калібрування

Калібрувальна пряма будується на підставі аналізу більшої кількості розчинів, ніж аналіз випробовуваного зразка. Тому, за аналогією з МС (див. вище), можна припустити, що в МКГ невизначеність калібрування також буде незначущою. Таке припущення незначущості калібрування знаходиться цілком у річищі звичайного підходу під час валідації методик у МС, і отримані формули для критеріїв співпадають з отриманими раніше для МС (див. розділ 4).

У межах такого припущення величина Δ_{cal} має бути незначущою порівнюючи з максимально допустимою повною невизначеністю методики аналізу $\max \Delta_{As}$, тобто, урахувавши (6.6):

$$\text{МКГ. Підхід 1: } \Delta_{cal} \leq \max \Delta_{cal} = 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.10 \times B. \quad (6.17)$$

Це співвідношення співпадає з вимогами (6.9) МС. З рівнянь (6.15-6.17) отримаємо вимоги до залишкового стандартного відхилення SD_{rest} калібрувальної прямої:

$$SD_{rest} \leq \max SD_{rest} = \max \Delta_{cal} / 2.35 = 0.10 \times B / 2.35 = 0.0435 \times B. \quad (6.18)$$

Зі співвідношень (4.5, 6.18) знайдемо вимоги до $\min R^2$ або $\min R$ у Підході 1.

Перевагою Підходу 1 є те, що в цьому разі невизначеність калібрування можна не враховувати в повній невизначеності аналізу Δ_{As} , яка, відповідно до (6.16-6.17), зводиться тільки до Δ_{sample} , тобто, урахувавши (6.6):

$$\Delta_{sample} \leq \max \Delta_{sample} \approx \max \Delta_{As} = 0.32 \times B. \quad (6.19)$$

Це суттєво спрощує оцінку результатів проведення валідації. Крім того, Підхід 1 всю допустиму невизначеність аналізу переносить на випробовуваний розчин, що робить вимоги до метрологічних характеристик методики більш ліберальними.

Недоліком Підходу 1 є те, що він висуває достатньо жорсткі вимоги (6.18) до калібрувальної прямої, які не завжди можуть бути реалізовані на практиці. Це викликано, зокрема, і малим числом ступенів свободи прямої ($\nu = 3$), що призводить до великого (2.35) коефіцієнта Стюдента в рівнянні (6.14).

<i>Діапазон 80-120 %</i>								
5	1.6	0.50	1.6	0.22	0.99981	1.13	0.48	0.99908
7.5	2.4	0.75	2.4	0.33	0.99957	1.70	0.72	0.99792
10	3.2	1.00	3.2	0.44	0.99924	2.26	0.96	0.99631
12.2	3.9	1.22	3.9	0.53	0.99887	2.76	1.17	0.99450
15	4.8	1.50	4.8	0.65	0.99830	3.39	1.44	0.99169
20	6.4	2.00	6.4	0.87	0.99697	4.53	1.92	0.98522
<i>Діапазон 70-130 %</i>								
5	1.6	0.50	1.6	0.22	0.99992	1.13	0.48	0.99959
7.5	2.4	0.75	2.4	0.33	0.99981	1.70	0.72	0.99908
10	3.2	1.00	3.2	0.44	0.99966	2.26	0.96	0.99836
12.2	3.9	1.22	3.9	0.53	0.99950	2.76	1.17	0.99756
15	4.8	1.50	4.8	0.65	0.99924	3.39	1.44	0.99631
20	6.4	2.00	6.4	0.87	0.99865	4.53	1.92	0.99343
<i>Діапазон 50-150 %</i>								
5	1.6	0.50	1.6	0.22	0.99997	1.13	0.48	0.99985
7.5	2.4	0.75	2.4	0.33	0.99993	1.70	0.72	0.99967
10	3.2	1.00	3.2	0.44	0.99988	2.26	0.96	0.99941
12.2	3.9	1.22	3.9	0.53	0.99982	2.76	1.17	0.99912
15	4.8	1.50	4.8	0.65	0.99973	3.39	1.44	0.99867
20	6.4	2.00	6.4	0.87	0.99952	4.53	1.92	0.99764

З Табл. 6.3 видно, що вимоги до квадрата коефіцієнта кореляції R_c^2 залежать від діапазону і допусків вмісту і для фармакопейного діапазону 70-130 % у всіх випадках перевищують 0.997.

6.10. Критерії оцінювання правильності і прецизійності (збіжності) результатів аналізу модельних сумішей

6.10.1. Систематична похибка

Як вже зазначалося вище, систематична похибка (яка характеризує правильність) має дві складові.

Систематична похибка першого типу δ_1 спричинена матричними ефектами (ефекти плацебо) і перевіряється на стадії перевірки специфічності методики. Цей тип систематичної похибки приблизно однаковий для всіх концентрацій діапазону і, відповідно до (6.7-6.8), має бути незначущим. Величина δ_1 може бути, у принципі, зменшена до прийнятного рівня під час виконання власне аналізу, наприклад, шляхом введення плацебо в стандартний або калібрувальні розчини.

Якщо вимоги (6.8) виконуються під час перевірки специфічності методики, то під час аналізу модельних сумішей систематична похибка для середнього значення ступеня витягнення RR також має бути незначущою, тобто:

$$| \overline{RR} - 100 | \leq \max \delta_1 = 0.10 \times B. \quad (6.23)$$

Систематична похибка другого типу δ_2 спричинена похибкою калібрування, може суттєво різнитися для різних концентрацій і є принципово неусувною, хоча і має різну природу в МС і МКГ.

У МС величина δ_2 спричинена значущістю вільного члена a прямої (6.1а). Критерії незначущості величини δ_2 даються співвідношеннями (6.9-6.10).

У МКГ величина δ_2 спричинена відхиленнями від лінійності і є частиною невизначеності калібрування Δ_{cal} , яка характеризується залишковим стандартним відхиленням SD_{rest} і відповідним йому довірчим інтервалом (6.14). Оскільки калібрувальна пряма знаходиться методом найменших квадратів, то фактичні відхилення від неї мають різну величину і знак для різних концентрацій. Тому, взагалі, експериментальну систематичну похибку δ_2 необхідно було б визначати для кожного вузького інтервалу концентрацій, що на практиці майже не здійснити. Оскільки модельні розчини охоплюють усю сукупність концентрацій у межах аналітичного діапазону, то систематична похибка для них під час складання має значною мірою компенсуватися. Тому середнє значення ступеня витягнення RR (6.3) для цих розчинів не повинно мати значущої систематичної похибки δ_2 . Результати аналізу модельних сумішей за допомогою МС мають відповідати вимогам Табл. 6.2.

Ураховуючи також незначущість систематичної похибки δ_1 , неважко побачити, що і для МС, і для МКГ мають виконуватися вимоги (6.23) незначущості систематичної похибки δ для середнього за всіма модельними розчинами ступеня витягнення RR (6.3). Ці вимоги забезпечуються вимогами специфічності (6.8), вимогами (6.10) у МС, вимогами (6.18) (*Підхід 1*) і (6.22) (*Підхід 2*) у МКГ, які перевіряються під час валідації і мають відповідати вимогам Табл. 6.3.

6.10.2. Прецизійність (збіжність) результатів

У МС і *Підході 1* МКГ невизначеність калібрування Δ_{cal} є незначущою, тому під час аналізу модельних сумішей повна невизначеність аналізу Δ_{As} спричинена невизначеністю аналізу саме випробовуваного зразка Δ_{sample} .

Загалом невизначеність (Δ_{sample}) збіжності одиничного результату ступеня витягнення RR для $n = 9$ модельних розчинів не має перевищувати максимально допустиму повну невизначеність методики аналізу $\max \Delta_{As}$, тобто, з урахуванням (6.6):

метод стандарту і Підхід 1:

$$\Delta_{sample} = t(95\%, n-1) \times SD_{RR} = 1.86 \times SD_{RR} \leq \max \Delta_{As} = 0.32 \times B. \quad (6,24)$$

Тут SD_{RR} — стандартне відхилення ступеня витягнення RR (6.3).

У разі *Підходу 2* МКГ маємо значущу невизначеність калібрування Δ_{cal} , і вимоги до збіжності ступеня витягнення RR , відповідно до (6.21), є більш жорсткими:

$$\text{Підхід 2: } \Delta_{sample} = 1.86 \times SD_{RR} \leq 0.707 \times \max \Delta_{As} = 0.226 \times B. \quad (6.25)$$

6.11. Критерії придатності системи

Завдання тесту на придатність системи — переконатися, що метрологічні характеристики системи відповідають тим, які були отримані під час валідації.

Придатність калібрувального графіка. У разі МКГ це означає, що метрологічні характеристики калібрувального графіка (залишкове стандартне відхилення SD_{rest} і коефіцієнт кореляції R_c) і збіжність повторних вимірювань аналітичного сигналу (абсорбції) $\Delta_{A,r}$ мають відповідати вимогам придатності системи.

У разі МС єдиною експериментально спостережуваною метрологічною величиною є збіжність повторних вимірювань абсорбції $\Delta_{A,r}$ для випробовуваного і стандартного розчинів.

У разі МКГ придатність системи для величин SD_{rest} і R_c означає, що вони мають задовольняти вимоги коректності лінійності (Табл. 6.3).

Складніша ситуація з контролем збіжності паралельних вимірювань абсорбції ($\Delta_{A,r}$). У спектрофотометричному аналізі в УФ- і видимій ділянках спектра основну частину повної невизначеності методики аналізу становить невизначеність пробопідготовки і калібрування. Водночас збіжність аналітичного сигналу $\Delta_{A,r}$ зазвичай є незначущою порівнюючи з повною невизначеністю методики аналізу. Можна припустити, що така сама ситуація і для вимірювання абсорбції у разі методу ААС. Зважаючи на принцип незначущості (див. розділ 4.4.1) і вимоги (6.7) до повної невизначеності методики аналізу, отримуємо вимоги до відносної невизначеності збіжності паралельних вимірювань абсорбції $\Delta_{A,r}$:

$$\Delta_{A,r} \leq 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.10 \times B. \quad (6.26)$$

Ураховуючи, що

$$\Delta_{A,r} = t(95\%, n-1) \times SD_{A,r} / \sqrt{n}, \quad (6.27)$$

зі співвідношень (6.26-6.27) можна отримати вимоги до відносного стандартного відхилення повторних вимірювань абсорбції $SD_{A,r}$ залежно від числа n паралельних вимірювань:

$$SD_{A,r} \leq \max SD_{A,r} = 0.10 \times B \times \sqrt{n} / t(95\%, n-1). \quad (6.28)$$

Значення $\max SD_{A,r}$, залежно від числа n паралельних вимірювань і допусків вмісту B , які розраховані за співвідношенням (6.28), наведені в Табл. 6.4.

Таблиця 6.4

Залежність $\max SD_{A,r}$ від числа n паралельних вимірювань абсорбції і допусків вмісту B для МКГ і **МС**

$n =$	3	4	5	6	7	8	9
$t(95\%, n - 1)$ =	2.92	2.35	2.13	2.02	1.94	1.89	1.86
$B, \% \downarrow$	Значення $\max SD_{A,r}, \%$						
5.0	0.30	0.42	0.52	0.61	0.68	0.75	0.81
7.5	0.44	0.64	0.79	0.91	1.02	1.12	1.21
10.0	0.59	0.85	1.05	1.22	1.36	1.49	1.61
12.2	0.72	1.04	1.28	1.48	1.66	1.82	1.97
15.0	0.89	1.27	1.57	1.82	2.04	2.24	2.42
20.0	1.19	1.70	2.10	2.43	2.72	2.99	3.23

У тому разі, коли вимоги Табл. 6.4 для цього числа n не виконуються, необхідно збільшити n .

6.12. Межа виявлення (DL) і межа кількісного визначення (QL)

Ці величини не вимагаються під час проведення валідації методик кількісного визначення, але вони корисні як інформація про те, наскільки діапазон застосування методики перевищує її граничні можливості («запас міцності» методики). У разі контролю домішок знайдення величин DL і QL є обов'язковим (див. розділ 5).

Величини DL і QL можуть бути розраховані зі стандартного відхилення s_a , вільного члена лінійної залежності $A = b \times X + a$ і її кута нахилу b . Відповідно до співвідношення (5.1-5.3), мають виконуватися такі вимоги:

$$DL = 3.3 \times s_a \leq 32\%. \quad (6.29)$$

$$QL = 10 \times s_a \leq 32\%. \quad (6.30)$$

Величина DL розраховується в цьому разі у відсотках до максимально допустимого вмісту домішок ImL , а QL — у відсотках до номінального вмісту.

Величини DL і QL розраховують із параметрів прямої, побудованої за 9 модельним сумішам. У принципі, DL і QL можна розраховувати і з параметрів калібрувальної прямої, побудованої за 5 точкам. Однак через мале число ступенів свободи ($\nu = 3$), величини DL і QL у цьому разі є занадто ненадійними.

6.13. Внутрішньолабораторна прецизійність

Внутрішньолабораторна прецизійність характеризує вплив на аналіз внутрішньолабораторних факторів: різні дні, аналітики, обладнання тощо. Під час перевірки внутрішньолабораторної прецизійності доцільно перевірити:

- 1) відтворюваність розроблених параметрів придатності системи, тобто прийнятності залишкового стандартного відхилення SD_{rest} , коефіцієнта кореляції R_c (Табл. 6.3) і $SD_{A,r}$ збіжності паралельних вимірювань абсорбції (Табл. 6.4);
- 2) відтворюваність знайдених значень концентрації.

Якщо в разі перевірки придатності системи ситуація достатньо однозначна (мають виконуватися критерії придатності), то для перевірки відтворюваності знайдених значень концентрації можуть бути запропоновані різні підходи. Наприклад, приготувати три суміші зі складом, близьким до номінального, і проаналізувати їх у два різних дні. Різниця між середніми (за трьома сумішами) ступенями витягнення у два різних дні ($RR(1)$ і $RR(2)$) має бути практично (див. розділ 2.3.3) незначущою, тобто:

$$|RR(2) - RR(1)| \leq \sqrt{2} \times \max \Delta_{As} / \sqrt{3} = \sqrt{2/3} \times 0.32 \cdot B = 0.26 \times B. \quad (6.31)$$

Крім того, для кожного дня також мають виконуватися вимоги придатності системи (див. розділ 6.10).

Типовий приклад проведення валідації методики кількісного визначення у варіанті методу калібрувального графіка наведений у *Прикладі 3*.